

Univerza  
v Ljubljani *Veterinarska*  
fakulteta



Bety Breznik

**PROBLEMI UPORABE KOKCIDIOSTATIKOV V  
INTENZIVNI REJI PERUTNINE**

*Doktorska disertacija*

Ljubljana, 2015



Univerza  
v Ljubljani *Veterinarska*  
fakulteta



UDK 636.5.09:614.31:637.4:637.54:615.015.283(043.3)

mag. Bety Breznik, dr. vet. med.

**PROBLEMI UPORABE KOKCIDIOSTATIKOV V  
INTENZIVNI REJI PERUTNINE**

Doktorska disertacija

**PROBLEMS RELATED TO USE OF THE COCCIDIOSTATS  
IN INTENSE POULTRY BREEDING**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2015



**Mag. Bety Breznik, dr. vet. med.**

**PROBLEMI UPORABE KOKCIDIOSTATIKOV V INTENZIVNI REJI  
PERUTNINE**

Delo je bilo opravljeno na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani na:

- Inštitutu za higieno in patologijo prehrane živali,
- Inštitutu za zdravstveno varstvo perutnine,
- Inštitutu za higieno živil in bromatologijo in
- Inštitutu za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo.

***Predstojniki inštitutov:***

doc. dr. Breda Jakovac Strajn, dr. vet. med.,

prof. dr. Olga Zorman Rojs, dr. vet. med.,

prof. dr. Ksenija Šinigoj Gačnik, uni. dipl. kem.,

doc. dr. Mitja Gombač, dr. vet. med.

***Javni zagovor je bil opravljen:*** \_\_\_\_\_

***Mentor:*** prof. dr. Anton Vengušt

***Somentorica:*** prof. dr. Ksenija Šinigoj Gačnik

***Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:***

prof. dr. Uroš Pestevšek, predsednik in član.

prof. dr. Olga Zorman Rojs, članica.

prof. dr. Milan Pogačnik, član.

prof. dr. Andrej Orešnik, član.



## **IZJAVA O DELU**

**Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in da nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.**

**V Ljubljani, september 2015**

**Bety Breznik**





*Ne trudim se več za vsako ceno ugajati drugim,*

*storim pa vse, da osrečim sebe...*

*Za moje čudovito novo življenje !!!*



## **VSEBINA**

<b>IZVLEČEK</b> .....	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>13</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>15</b>
<b>2. PREGLED PODATKOV IZ LITERATURE</b> .....	<b>19</b>
2.1 KOKCIDIOZA V INTENZIVNI REJI PERUTNINE .....	19
2.1.1 Vrste in značilnosti kokcidij.....	20
2.1.2 Epizootiologija kokcidioze.....	21
2.1.3 Patogeneza .....	22
2.1.4 Klinični znaki.....	23
2.1.5 Diagnostika kokcidioze.....	24
2.1.6 Preprečevanje in zdravljenje .....	25
2.2 IONOFORNI ANTIBIOTIKI – KOKCIDIOSTATIKI.....	26
2.2.1 Delovanje ionofornih antibiotikov.....	26
2.2.2 Lasalocid .....	27
2.2.3 Lasalocid in njegovi pripravki.....	28
2.2.4 Fizikalno - kemijske lastnosti lasalocida in stabilnost na temperaturo in pH .....	31
2.2.5 Antibakterijsko delovanje lasalocida.....	32
2.2.6 Postopek pridobitve dovoljenja za krmne dodatke .....	33
2.2.7 Pojavljanje odpornosti na kokcidiostatike .....	33
2.3 ŠTUDIJE VARNOSTI UPORABE LASALOCIDA PRI CILJNIH ŽIVALIH.....	35
2.3.1 Metabolizem lasalocida in tolerančni testi pri ciljnih živalih .....	35
2.4 TOKSIČNO DELOVANJE LASALOCIDA PRI CILJNIH ŽIVALIH .....	36
2.4.1 Piščanci in purani.....	36
2.5 TOKSIČNOST LASALOCIDA ZA NECILJNE VRSTE ŽIVALI .....	37

---

2.6	ŠTUDIJE KRONIČNE TOKSIČNOSTI PRI LABORATORIJSKIH ŽIVALIH .....	39
2.7	FARMAKOKINETIKA IN METABOLIZEM LASALOCIDA IN NJEGOVO NALAGANJE V TKIVIH .....	40
2.7.1	<i>Farmakokinetika pri ciljnih živalskih vrstah (piščanci in purani) .....</i>	40
2.7.2	<i>Farmakokinetika lasalocida pri neciljnih živalskih vrstah .....</i>	42
2.7.2.1.	Kokoši nesnice .....	42
2.7.2.2.	Prepelice in fazani .....	45
2.7.2.3.	Ostale živali .....	45
2.8	OPREDELITEV TVEGANJA PRI UPORABI LASALOCIDA IN VZAJEMNO DELOVANJE ZDRAVIL .....	46
2.8.1	<i>Tveganje za zdravje pri neciljnih živalih, pri naključnem zaužitju krme za ciljne živali .....</i>	47
2.9	NAVZKRIŽNO ONESNAŽENJE KRME V PROIZVODNEM PROCESU .....	47
2.9.1	<i>Ostanki lasalocida v krmi za neciljne živali .....</i>	52
2.10	OSTANKI LASALOCIDA V ŽIVILIH ŽIVALSKEGA IZVORA NECILJNIH ŽIVALI .....	53
2.11	TVEGANJE ZA ZDRAVJE LJUDI .....	58
2.12	VPLIVI NA OKOLJE .....	61
2.13	UGOTAVLJANJE LASALOCIDA V IZTREBKIH.....	61
2.14	OBNAŠANJE LASALOCIDA V NARAVNEM OKOLJU IN TLEH.....	63
2.14.1	<i>Biorazgradnja ter vezanje in absorpcija v tleh .....</i>	63
2.14.2	<i>Obnašanje v vodi .....</i>	64
2.14.3	<i>Vplivi na rastline .....</i>	65
2.14.4	<i>Vplivi na nečlenarje in mikroorganizme v zemlji .....</i>	65
2.14.5	<i>Toksičnost za vodne organizme .....</i>	66
2.15	JAJCA V PREHRANI IN PODATKI O PROIZVODNJI IN POTROŠNJA JAJC TER PERUTNINSKEGA MESA V SLOVENIJI IN EU .....	66

---

<b>3.</b>	<b>MATERIALI IN METODE DELA .....</b>	<b>70</b>
3.1	POSKUSI NA ŽIVALIH IN POGOJI REJE .....	70
3.1.1	<i>Poskus 1, koncentracija lasalocida v krmi 5,7 mg/kg .....</i>	<i>72</i>
3.1.1.1.	Žrtvovanje živali in odvzem vzorcev .....	72
3.1.1.2.	Vzorčenje jajc in iztrebkov .....	72
3.1.2	<i>Poskus 2, koncentracija lasalocida v krmi 3,2 mg/kg .....</i>	<i>73</i>
3.1.2.1.	Žrtvovanje živali in odvzem vzorcev .....	73
3.1.2.2.	Vzorčenje jajc in iztrebkov .....	73
3.1.3	<i>Poskus 3a, koncentracija lasalocida v krmi 1,1mg/kg .....</i>	<i>73</i>
3.1.3.1.	Žrtvovanje živali in odvzem vzorcev .....	74
3.1.3.2.	Vzorčenje jajc in iztrebkov .....	74
3.1.4	<i>Poskus 3 b, koncentracija lasalocida v krmi 1,1mg/kg .....</i>	<i>75</i>
3.1.4.1.	Žrtvovanje živali in odvzem vzorcev .....	75
3.1.4.2.	Vzorčenje jajc in iztrebkov .....	75
3.1.5	<i>Standardne raztopine.....</i>	<i>76</i>
3.1.6	<i>Reagenti.....</i>	<i>76</i>
3.1.7	<i>Raztopine .....</i>	<i>77</i>
3.1.8	<i>Steklovina in potrošni material .....</i>	<i>78</i>
3.1.9	<i>Aparature.....</i>	<i>78</i>
3.1.10	<i>Instrumenti.....</i>	<i>79</i>
3.1.10.1.	Sistem za tekočinsko kromatografijo s fluorescenčno detekcijo .....	79
3.1.10.2.	Sistem za tekočinsko kromatografijo z masno detekcijo .....	79
3.1.11	<i>Določanje lasalocida v krmi.....</i>	<i>79</i>
3.1.11.1.	Priprava vzorcev krme .....	80
3.1.11.2.	Pogoji tekočinske kromatografije s fluorescenčno detekcijo .....	80
3.1.11.3.	Karakteristike metode .....	80
3.1.12	<i>Določanje lasalocida v bioloških vzorcih.....</i>	<i>80</i>

---

3.1.12.1.	Ekstrakcija in čiščenje vzorcev .....	80
3.1.12.1.1.	Jajčni rumenjaki, beljaki in jajčni folikli .....	80
3.1.12.1.2.	Abdominalna maščoba in koža z maščobo .....	81
3.1.12.1.3.	Mišično tkivo .....	82
3.1.12.1.4.	Jetra, ledvice .....	82
3.1.12.2.	Pogoji meritev z uporabo LC-MS/MS .....	82
3.1.12.3.	Vrednotenje rezultatov in karakteristike metode .....	83
3.1.13	<i>Določanje lasalocida v iztrebkih</i> .....	85
3.1.13.1.	Ekstrakcija in čiščenje vzorcev .....	85
3.1.13.2.	Pogoji tekočinske kromatografije s fluorescenčno detekcijo .....	85
3.1.13.3.	Karakteristike metode .....	86
3.2	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV .....	86
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>88</b>
4.1	POSKUS 1 (5,7 MG/KG LASALOCIDA V KRMI) .....	89
4.1.1	<i>Jetra</i> .....	89
4.1.2	<i>Ledvica</i> .....	90
4.1.3	<i>Mišično tkivo</i> .....	92
4.1.4	<i>Abdominalna maščoba</i> .....	93
4.1.5	<i>Koža z maščobo</i> .....	95
4.1.6	<i>Jajčni beljak</i> .....	96
4.1.7	<i>Rumenjaki</i> .....	98
4.1.8	<i>Jajčni folikli</i> .....	103
4.2	POSKUS 2 (3,2 MG/KG LASALOCIDA V KRMI) .....	107
4.2.1	<i>Jetra</i> .....	107
4.2.2	<i>Ledvica</i> .....	109
4.2.3	<i>Koža z maščobo</i> .....	110

4.2.4	<i>Rumenjaki</i> .....	111
4.2.5	<i>Jajčni folikli</i> .....	114
4.3	POSKUS 3 (1,1 MG/KG LASALOCIDA V KRMI).....	117
4.3.1	<i>Jetra</i> .....	117
4.3.2	<i>Koža z maščobo</i> .....	118
4.3.3	<i>Rumenjaki</i> .....	119
4.3.4	<i>Jajčni folikli</i> .....	122
4.4	REZULTATI ANALIZIRANIH VZORCEV IZTREBKOV .....	132
5.	<b>RAZPRAVA</b> .....	<b>134</b>
6.	<b>ZAKLJUČKI</b> .....	<b>155</b>
7.	<b>POVZETEK</b> .....	<b>156</b>
8.	<b>SUMMARY</b> .....	<b>161</b>
9.	<b>ZAHVALA</b> .....	<b>166</b>
10.	<b>LITERATURA</b> .....	<b>168</b>

## SEZNAM OKRAJŠAV

ADI	dnevno sprejemljiv vnos določene substance
CONTAM	Znanstveni odbor za onesnaževala v prehranjevalni verigi pri Evropski agenciji za varnost hrane
CVMP	Odbor za zdravila za uporabo v veterinarski medicini pri Evropski agenciji za zdravila
DČ	Država članica EU
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane
EK	Evropska Komisija
EMA	Evropska agencija za zdravila
EU	Evropska unija
FEEDAP	Znanstveni odbor za dodatke in izdelke ali snovi, ki se uporabljajo v živalski krmi pri Evropski agenciji za varnost hrane
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IUPAC	sistematična metoda poimenovanja organskih kemičnih spojin
LD50	srednja smrtna doza
LOD	meja zaznavnosti
LOQ	meja vrednotenja
MRL	maksimalno dovoljene količine ostankov
NOEL	stopnja neopaznega učinka
RASFF	sistem hitrega obveščanja za živila in krmo
TLC	tankoplastna kromatografija
t. m.	telesna masa
LC-MS/MS	metoda tekočinske kromatografije z masno detekcijo



## **PROBLEMI UPORABE KOKCIDIOSTATIKOV V INTENZIVNI REJI PERUTNINE**

### **IZVLEČEK**

*Ključne besede: Hrana, nadzor; hrana, dodatki - analize; kokcidiostatiki - analize; ostanki zdravil - farmakokinetika; lasalocid - farmakokinetika; jajca - analize; feces - analize; kromatografija visokotlačna, tekočinska - metode; masna spektrometrija - metode; perutnina*

V raziskavi smo proučevali odvisnost ostankov kokcidiostatika lasalocida v jajcih, jajčnih foliklih, tkivih in iztrebkih kokoši nesnic od njegove vsebnosti v krmi. Hipoteza je bila, da je koncentracija ostankov lasalocida v tkivih in iztrebkih odvisna od doze lasalocida v krmi. Kokoši pasemskega tipa Hisex brown so v poskusih s krmo sedem dni dobivale 5,7 mg; 3,2 mg in 1,1 mg lasalocida na kg krme. Predpisana količina lasalocida kot krmnega dodatka za piščance in purane je 75 do 125 mg/kg krme, MRL za jajca je 150 µg/kg. Za določanje lasalocida v krmi smo uporabili uradno metodo (Uredba Komisije (ES) 152/2009), za določanje vsebnosti lasalocida v jajcih in tkivih nesnic smo uporabili LC-MS/MS metodo, za določanje lasalocida v iztrebkih kokoši pa smo uporabili modificirano metodo HPLC s fluorescenčno detekcijo. Pri vsebnosti lasalocida 5,7 mg/kg krme smo ugotovili lasalocid v rumenjakih že drugi dan krmljenja, največja ugotovljena vrednost je bila 617 µg/kg (sedmi dan); vsebnosti nad vrednostjo MRL za jajca so se pojavljale še pet dni po prenehanju dajanja krme. Vsebnosti lasalocida v jetrih, ledvicah in koži z maščobo so bile najvišje sedmi dan poskusa (193; 54; 80 µg/kg) in so se hitro znižale dva dni po prenehanju krmljenja z lasalocidom. Ugotovljene vsebnosti v mišičnem tkivu in jajčnem beljaku so bile zelo nizke (do 0,5; do 2,4 µg/kg). Povprečna vsebnost lasalocida v jajčnih foliklih sedmi dan je bila 1693 µg/kg. Pri vsebnosti lasalocida 3,2 mg/kg krme smo njegove ostanke v rumenjaku prvič ugotovili tretji dan poskusa (21 µg/kg), najvišja ugotovljena vsebnost pa je bila 478 µg/kg (deveti dan). Vsebnosti nad vrednostjo MRL za jajca so se pojavljale še štiri dni po prenehanju dajanja krme (181 µg/kg). Vsebnosti lasalocida v jetrih, ledvicah in koži z maščobo so bile najvišje šesti dan (136; ; 51; ; 35 µg/kg); po devetem dnevu so bile pod mejo zaznavnosti metode. Povprečna vsebnost lasalocida v jajčnih foliklih sedmi dan je bila 1892 µg/kg. Pri koncentraciji lasalocida 1,1 mg/kg krme smo vsebnost lasalocida v rumenjakih prvič ugotovili četrti dan (43 µg/kg), najvišja

ugotovljena vsebnost je bila 353 µg/kg (na deveti dan poskusa). Vsebnosti nad vrednostjo MRL za jajca so se pojavljale še tri dni po prenehanju dajanja krme (200 µg/kg). Vsebnosti lasalocida v jetrih in koži z maščobo osmi dan so bile 20 in 28 µg/kg. V jajčnih foliklih so bile od petega do dvanajstega dne ugotovljene naslednje povprečne vsebnosti lasalocida: 154, ; 452, ; 281, ; 346, ; 177, ; 159, ; 84 in 84 µg/kg. Vrednosti MRL za tkiva kokoši nesnic, so bile pri analiziranih tkivih presežene pri koncentracijah lasalocida v krmi 5,7 in 3,2 mg/kg. ADI za lasalocid na priporočen obrok jajc ni bil presežen pri nobeni koncentraciji lasalocida v krmi. Pri vseh koncentracijah lasalocida v krmi smo dokazali povezavo med maso folikla in vsebnostjo lasalocida v foliklu ( $R_s > 0,7$ ). Pri vseh treh poskusih smo ugotovili, da se je lasalocid v iztrebkih kokoši pojavil že prvi dan krmljenja. Pri koncentraciji 5,7 mg/kg in 3,2 mg/kg je vsebnost lasalocida v iztrebkih naraščala do sedmega dne in po prenehanju dajanja krme z lasalocidom izredno hitro padla. Lasalocid smo v iztrebkih ugotovili še osmi dan (pri 5,7 mg/kg ) in deseti dan (pri 3,2 mg/kg). Kasneje v iztrebkih lasalocida nismo več ugotovili. Pri koncentraciji lasalocida (1,1 mg/kg) krme so bile vsebnosti lasalocida vse dni poskusa približno na enaki ravni (2,5 µg/kg). Prisotnost lasalocida v krmi za kokoši nesnice privede do njegovih zaostankov v živilih. Posebej so problematični rumenjaki in jajčni folikli, pa tudi iztrebki. Obsežno raziskovalno delo je pokazalo, da lahko dovoljena vsebnost lasalocida v krmi (1,1 mg/kg), privede do njegovih ostankov v rumenjaku in jajčnih foliklih, ki presegajo vrednosti MRL za jajca. Zato je priporočljivo, da v primeru, ko jajca uporabljamo kot samostojno živilo, to dejstvo upoštevamo, ker lahko prihaja do tveganja za zdravje ljudi.

## **PROBLEMS RELATED TO USE OF THE COCCIDIOSTATS IN INTENSE POULTRY BREEDING**

### **ABSTRACT**

**Key words:** *Food inspection; foodadditives - analysis; coccidiostats - analysis; drug residues - pharmacokinetics; lasalocid - pharmacokinetics; eggs - analysis; feces - analysis; chromatography, high pressure, liquid - methods; tandem mass spectrometry - methode; poultry*

In the present research we investigated the residua of lasalocid in eggs, egg follicles, tissues and faeces of poultry, dependent on the concentration of the tested pharmaceutical in their feed. Hens of Hisex brown breed have been receiving treated feed for seven days with 5.7; 3.2 and 1.1 mg/kg of lasalocid and 14 days feed without additives.

For determination of lasalocid in feed we used the method published in Commission Regulation (EC, No 152/2009), for lasalocid determination in eggs and tissues of hens we used LC-MS/MS method, whereas for faeces samples we used the modified HPLC method with fluorescence detection.

Lasalocid (at concentration 5.7 mg/kg in feed) was detected in egg yolk already on the 2nd day after feeding, the highest concentration of lasalocid was 617 µg/kg (7<sup>th</sup> day); the concentrations above MRL for eggs were detected even 5 days after having stopped giving the animals treated feed (226 µg/kg).

Presence of lasalocid in liver, kidney and skin with fat was highest on the 7th day of the experimental testing, after day 9 we observed fast drop of lasalocid concentrations, in muscle tissue and yolk, they were very low (to 0.5; to 2.4 µg/kg); in egg follicles we found lasalocid also on the 7th day at concentration of 1693 µg/kg.

At concentration 3.2 mg/kg in feed, residues of lasalocid in yolk were first determined on the 3rd day, whereas maximal concentration was 478µg/kg on the 9th day, concentrations above MRL were observed in the 4 days after stopping the treatment (181 µg/kg). Residues of lasalocid in liver, kidney and in skin with fat were maximal on the 6th day (136; 51; and 35

µg/kg), while they were below detection limit on the 9th day. In egg follicles we observed 1892 µg/kg lasalocid on the 7th day.

At concentration 1.1 mg/kg, we first determined lasalocid on the 4th day, the highest concentration was 353 µg/kg (9th day), concentrations above MRL were observed three days after stopping the treatment (200 µg/kg). Concentration of lasalocid in liver and skin with fat were 20 and 28 µg/kg on the 8th day of the experiment.

From day 5 to day 12 the following average values of lasalocid were detected in egg follicles: 154, 452, 281, 346, 177, 159 and 84 µg/kg. MRL values for non-target animals were exceeded in treated feed at concentrations 5.7 and 3.2 mg/kg. ADI for lasalocid was not exceeded at none of the tested concentrations; however we managed to show correlation between mass of follicle and content of lasalocid in follicle ( $R_s > 0.7$ ).

In all three experiments with treated feed the analyzed faeces samples showed presence of lasalocid already on the first day. At concentration 5.7 mg/kg and 3.2 mg/kg lasalocid concentration was increasing till day 7 and fell quickly after stopping the feeding. Lasalocid was traced last in faeces on the 8th (5.7 mg/kg) and 10th day (3.2 mg/kg). All following analysis of faeces samples gave results below the limit of detection  $< 2.5 \mu\text{g/kg}$ . At concentration levels of lasalocid (1.1 mg/kg) measures values were all the time at averagely equal level of  $2.5 \mu\text{g/kg}$ .

With this thesis we proved that the presence of lasalocid in premix for poultry results in residues in feed, yolk, follicles and faeces. Presented work shows that the »allowed« concentration of lasalocid in feed (1.1 mg/kg) can be found in yolk and egg follicles at levels which are above determined MRL's for lasalocid. Therefore it is necessary that we consider the possibility of risk for human health, especially when eggs are used as single meals, with high-protein diets etc.

## 1. UVOD

Kokcidioza tako pri nas kot v svetu še vedno predstavlja gospodarsko najpomembnejšo parazitarno bolezen v intenzivni reji perutnine, še posebej v reji piščancev brojlerjev in puranov, zato se v intenzivni perutninski proizvodnji kokcidiostatiki pogosto uporabljajo v terapevtske in preventivne namene. Načini vnosa le-teh so različni, za preventivo pa prevladuje vnos s krmo. V proizvodnem postopku priprave krme lahko prihaja do nepredvidenih dogodkov, ki jih je večinoma težko nadzorovati ali preprečiti.

Zaradi tega področje intenzivne perutninske proizvodnje povsod po svetu spremlja tudi zakonska ureditev, ki ureja uporabo veterinarskih zdravil in krmnih dodatkov, tako z vidika zdravstvenega varstva živali, kot tudi z vidika varovanja zdravja ljudi, varstva potrošnikov in varstva okolja.

Kljub temu zaradi pogostih ostankov zdravil v krmilih, v katerih se le-ta ne bi smela nahajati, prihaja na eni strani vse pogosteje do ogrožanja zdravja živali, na drugi strani pa ti ostanki v živilih živalskega izvora predstavljajo tveganje za zdravje ljudi in obremenitev za okolje.

V članicah Evropske unije (EU) in drugod po svetu se zaradi zdravstvenih problemov vezanih na obolevanje perutnine s kokcijami kot zdravilo in zdravilni dodatki h krmi največ uporabljajo različni kokcidiostatiki (Kennedy in sod., 1996; Vengušt 2000; Donoghue 2003; Vandenberg in sod., 2012). Najpogosteje gre za polietrske antibiotike in kemoterapevtike. Pri uporabi kokcidiostatikov se soočamo z naslednjimi izzivi: pojav rezistence pri uporabi v terapevtske in preventivne namene, ostanki teh snovi v živilih živalskega izvora ter njihovo prehajanje v okolje. Da bi se izognili ostankom teh zdravil v živilih živalskega izvora, je za vse dovoljene kokcidiostatike, ki se uporabljajo kot krmni dodatki, predpisana tako imenovana čakalna doba (karenca), to je čas, ki mora preteči od zadnjega dajanja zdravila v krmo do dovoljene uporabe živil pridobljenih od živali, ki so zdravilno krmo uživale.

Med njimi se je kljub predpisani karenci in določitvi še sprejemljivih količin njegovih ostankov v živilih pokazal za posebno problematičnega lasalocid, ki se je začel pojavljati v jajcih, kjer ga sicer ne bi smelo biti, ker ni registriran kot krmni dodatek za kokoši nesnice.

Ugotovili so, da je vzrok pojavljanja lasalocida v jajcih tako imenovana navzkrižna kontaminacija ali neizogibni prenos, ki se mu je v proizvodnem procesu priprave krmil praktično nemogoče v celoti izogniti in se praviloma zgodi v mešalnicah krmil. Nosilci dejavnosti proizvodnje krme lahko v enem obratu proizvajajo različne vrste krme, prav tako se na isti proizvodni liniji eden za drugim proizvajajo različni tipi proizvodov. Tako se lahko krma, ki se proizvaja za neciljne vrste živali (to so živalske vrste, za katere uporaba določenega kokcidiostatika kot krmnega dodatka ni dovoljena), onesnaži s tehnično neizogibnimi sledmi sicer dovoljenih krmnih dodatkov, ki ostanejo v/ali na proizvodni liniji.

To neizogibno navzkrižno onesnaženje se lahko pojavlja pri vseh stopnjah proizvodnje in predelave krme in tudi med skladiščenjem ali prevozom krme.

Ker je v mešalnicah krmil s stališča proizvodnega procesa nemogoče zagotoviti popolno »čistost« transportnih poti, mešalcev, mlinov in ostalih tehničnih pripomočkov, se je pokazalo, da je kljub upoštevanju načel dobre proizvodne prakse kot posledica nenamerne navzkrižne kontaminacije, v transportnih poteh in strojih ter opremi v mešalnicah krmil možna prisotnost določene količine kokcidiostatikov. Ta je odvisna tudi od adhezivne sposobnosti kokcidiostatika, velikosti delcev (ali je zdravilo v obliki praška ali granulata) in specifične teže ter elektrostatičnih lastnosti posameznega kokcidiostatika. Splošno uveljavljen izraz za tovrstno onesnaženje krme je navzkrižna kontaminacija ali prenos (angleško »cross-contamination« ali »carry-over«).

Zaradi vseh naštetih dejavnikov in dejstva, da se je v praksi praktično nemogoče izogniti navzkrižni kontaminaciji krme z zdravilnimi dodatki, posebno kokcidiostatiki, je Evropska agencija za varnost hrane (EFSA - European Food Safety Authority) na zahtevo Evropske Komisije (EK) sprejela številna mnenja o posledicah in tveganjih nenamerne navzkrižne kontaminacije za zdravje živali in javno zdravje. Znanstveni odbor za dodatke in izdelke ali snovi, ki se uporabljajo v živalski krmi (FEEDAP – Panel on Aditives and Products or Substances used in animal Feed) pri EFSA, je pripravil oceno tveganja za zdravje ljudi, če bi uživali živila, ki izvirajo od neciljnih živali. Ocena je temeljila na uporabi izračuna Kennedyja, ki je postavil povezavo med količino lasalocida v krmi in njegovo koncentracijo v jajcih in teoretični oceni upoštevanja domnevnih stopenj nenamerne navzkrižne kontaminacije krme s kokcidiostatiki, ki je predstavljala 2 %, 5 % in 10 % vsebnosti od najvišje predpisane terapevtske vrednosti za posamezen kokcidiostatik (Kennedy in sod., 1996). EK je tako leta

2009 sprejela Direktivo 2009/8, s katero je spremenila Prilogo 1 Direktive 2002/32, ki ureja vsebnost neželenih snovi v krmi in vanjo vključila tudi najvišje vsebnosti kokcidiostatikov, ki jih lahko vsebuje krma za neciljne živali in so posledica nenamerne navzkrižne kontaminacije.

Določila je, da so še sprejemljive tiste koncentracije zdravila v krmi, ki ustrezajo 1 % najvišjih predpisanih vsebnosti, ker naj te ne bi povzročale prekomernih ostankov kokcidiostatikov v živilih živalskega izvora, posebno v jajcih. Ugotovitev prisotnosti lasalocida v jajcih in njegovo nalaganje predvsem v rumenjaku je imela za posledico določitev vrednosti MRL za jajca, ki je 150 µg/kg (Uredba Komisije (ES) št. 1055/2006, Izvedbena Uredba Komisije (ES) št. 1277/2014). Prav tako so predpisane tudi največje dopustne vsebnosti za vsa ostala živila, ki izvirajo od neciljnih živali, in so namenjena prehrani ljudi (Uredba Komisije (ES) 124/2009 in Uredba Komisije (ES) 610/2012).

Po dostopnih podatkih predhodne raziskave niso bile opravljene na kokoših nesnicah v takšnem obsegu in na način, da bi z natančno določenim dodajanjem lasalocida v krmo (dodajanje določene koncentracije, ki je temeljila na polovičnih vsebnostih, ki jih je v analizi tveganja uporabila EFSA) ugotavljali vsebnosti njegovih ostankov v posameznih tkivih, kot so rumenjak, jajčni folikli, jajca, jetra, ledvica, maščoba in mišično tkivo. Prav tako ni podrobneje opredeljena in raziskana dinamika nalaganja in izginjanja lasalocida v tkivih kokoši nesnic (tako v času dajanja krme z lasalocidom, kot po prenehanju) in tudi ne v iztrebkih. Slednji lahko v določeni meri predstavljajo obremenitev za okolje, saj se kar 95 % zaužitih kokcidiostatikov izloči z iztrebki v okolje v nepredelani obliki in tako vplivajo na organizme, ki živijo v zemlji ter na rastline, prehajajo pa lahko tudi v podtalnico in površinske vode (EFSA 2004, EMA 2004, Hansen in sod., 2009).

Ker predstavljajo perutninsko meso in drugi perutninski izdelki ter jajca pomemben del živil v prehrani ljudi, je poznavanje problematike zaostankov zdravil v proizvodnem procesu perutnine ključnega pomena za zagotavljanje varne hrane. Prav tako je izrednega pomena poznavanje temeljnih principov nalaganja in razgradnje teh snovi v okolju.

Opravljen delo predstavlja doprinos k dvema pomembnima vejama moderne znanosti – prehranski in okoljski problematiki.

Zagotavljanje varne hrane in ohranjanje čistega okolja sta temeljni vodili trajnostnega razvoja v osveščenih in naprednih državah.

Ali so bile odločitve Komisije pravilne, smo poskusili ugotoviti z našimi raziskavami.

## **NAMEN DELA**

V doktorskem delu želimo odgovoriti na kar nekaj vprašanj, ki se pojavljajo v zvezi z lasalocidom v intenzivni reji perutnine. Pričakujemo, da bodo dobljeni rezultati podali odgovore na spodaj zastavljena vprašanja in tako pripomogli k boljšemu poznavanju dinamike nalaganja lasalocida v jajcih in ostalih tkivih kokoši nesnic ter v iztrebkih. S tem bo zagotovljeno pravočasno prepoznavanje morebitnega tveganja za zdravje ljudi in obremenitve okolja. Prav tako bodo dobljeni rezultati pripomogli k izboljšanju zakonodaje na tem področju.

1. Proučitev veljavnih pravnih podlag na področju uporabe kokcidiostatikov v EU in drugod po svetu.
2. Ugotoviti in proučiti časovni potek izločanja lasalocida v jajcih, jajčnih foliklih ter ostalih tkivih (jetra, ledvica, maščoba, koža z maščobo, mišično tkivo) in z iztrebki na podlagi točno določene količine lasalocida v krmi.
3. Ugotoviti, ali so zakonsko dovoljene vsebnosti lasalocida v krmi (1 % od najvišje predpisane vsebnosti lasalocida kot krmnega dodatka), ki so posledica navzkrižne kontaminacije v proizvodnem procesu ustrezne, da zaradi njih ne prihaja do preseganja MRL-vrednosti v različnih tkivih kokoši nesnic in s tem v živilih živalskega izvora za prehrano ljudi.
4. Ugotoviti, ali predstavlja uživanje jajčnega rumenjaka kot samostojnega živila, glede na priporočen dnevni vnos (ADI - vrednost), morebitno tveganje za zdravje ljudi.
5. Oceniti, ali je trenutno določena vrednost MRL za jajca zadovoljiva oziroma ustrezna tudi za rumenjak kot samostojno živilo.
6. Z rezultati praktičnega poskusa potrditi ali ovreči postavljeno teorijo o ostankih lasalocida v živilih glede predvidene navzkrižne kontaminacije.
7. Na podlagi rezultatov praktičnega poskusa preveriti izračun, ki ga je objavil Kennedy za oceno pričakovanih ostankov lasalocida v rumenjaku (Kennedy in sod., 1996).
8. Z uporabo analitske metode za ugotavljanje lasalocida v iztrebkih želimo proučiti dinamiko izločanja lasalocida z iztrebki ob znani koncentraciji v krmi in morebitni vpliv na okolje.



## 2. PREGLED PODATKOV IZ LITERATURE

### 2.1 KOKCIDIOZA V INTENZIVNI REJI PERUTNINE

Kokcidioza tako v svetu kot pri nas še vedno predstavlja gospodarsko najpomembnejšo parazitarno bolezen v intenzivni reji perutnine, še posebej v reji pitovnih piščancev ali brojlerjev. Pri piščancih brojlerjih parazitira sedem vrst kokcidijskih, najpogosteje pa se ugotavljajo obolenja z več vrstami kokcidijskih hkrati, med katerimi prevladujejo *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* in *Eimeria tenella*. Metafilaksa kokcidioze pri perutnini še vedno temelji na uporabi različnih kokcidiostatikov v krmnih mešanica (Vengušt in sod., 1998, Donoghue 2003; EFSA 2004; Vandenberghe in sod., 2012). Alternativno kokcidiostatikom predstavljajo cepiva, ki pa se še ne uporabljajo prav pogosto, razen pri matičnih jatah in v jatah konzumnih nesnic, čeprav je tendenca držav Evropske skupnosti zmanjšanje uporabe kokcidiostatikov zaradi zaostankov v živilih živalskega izvora in obremenjevanja okolja.

Kokcidioza domačih ptic in sesalcev je primarno črevesno obolenje, ki poteka v akutni ali kronični obliki. Podobno kot pri drugih parazitarnih boleznih je kokcidioza predvsem bolezen mladih živalih v intenzivni reji perutnine in kuncev. Bolezen se lahko pojavi tudi pri drugih vrstah domačih živali, posebno pri teletih in jagnjetih. Kokcidiozo povzročajo kokcidijski, znotrajcelični zajedalci iz družine *Eimeriidae*. V patologiji domačih živali se najbolj pogosto ugotavljajo vrste kokcidijskih iz rodov *Eimeria* in *Isospora*. Vrste iz rodu *Eimeria* se najpogosteje ugotavljajo pri perutnini, rastlinojedih in vsejedih, vrste iz rodu *Isospora* pa pri mesojedih. Kokcidijski iz obeh rodov parazitirajo v epitelni celici črevesja, redkeje v žolčevodih (kokcidioza jeter kuncev) in v ledvičnih tubulih (kokcidioza ledvic gosi). Kokcidijski so monokseni paraziti, ker posamezne vrste parazitirajo samo v eni živalski vrsti.

Kokcidijski lahko parazitirajo v črevesju, žolčevodih ali ledvičnih tubulih, v črevesni sluznici (epitelij črevesnih resic ali kripta) in tudi pod ali nad jedrom epitelni celic črevesja. Razvojni krog poteka v gostitelju in v zunanjem okolju brez vmesnega gostitelja. V zunanjem okolju so razvojne oblike oociste, v črevesju gostitelja pa trofozoiti, shizonti, merozoiti in gamete. Shizogonija in sporulacija sta nespolna načina razmnoževanja kokcidijskih, gametogonija pa je spolni način razmnoževanja. Kokcidijski iz rodu *Eimeria* se pri perutnini razmnožujejo v tankem in slepih črevesih. Invazije povzročajo manjšo ješčnost, slabšo resorbcijo hranljivih snovi, dehidracijo, izgubo krvi in večjo dovzetnost za bakterijske in virusne bolezni.

Protozoa ali praživali živijo aerobno ali anaerobno. Od bakterij se razlikujejo predvsem po tem, da se razmnožujejo ciklično z menjavo spolnega in nespolnega načina razmnoževanja, medtem ko govorimo pri bakterijah o razmnoževanju v obliki geometrijske progresije.

Vrste iz rodu *Eimeria* so opisane po morfoloških lastnostih oocist. Oociste so najpogosteje ovalne, lahko pa so tudi okroglaste, eliptične, cilindrične in hruškaste oblike. Oociste so velike od 10 do 40 µm. Ovojnica je zgrajena iz dveh plasti in je pogosto tanka, gladka in brezbarvna, lahko pa je tudi debelejša, hrapava in obarvana. V oocisti se nahaja protoplazmatska masa ali sporont. Sporulirane oociste vsebujejo štiri sporociste in vsaka sporocista ima po dva sporozoita. Med sporocistami se nahaja rezidualno telo, na ožjem delu oociste pa eno ali več polarnih zrn (Brglez, 1982).

### **2.1.1 Vrste in značilnosti kokcij**

Kokcidiozo povzročajo različne vrste protozojev iz rodu *Eimeria*.

Deblo *PROTOZOA*

Razred *APIKOMPLEXA (SPOROZOA)*

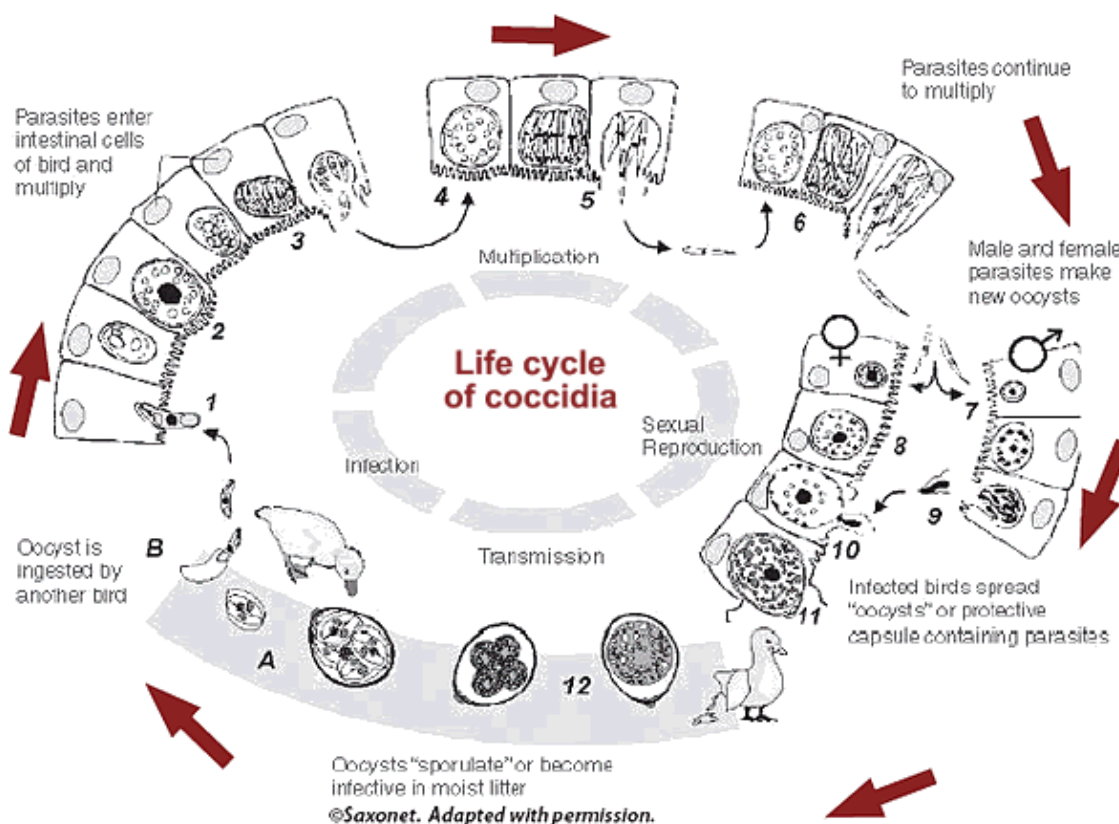
Red *COCCIDIA*

Družina *EMERIADAE*

Rod *EIMERIA*

Pri perutnini je razvojni krog tipičen za vse vrste kokcijev (slika 1). Po okužbi per os in po vplivu prebavnih sokov razpade zunanja ovojnica oocist. Osvobojeni sporozoiti prodrejo v epitelne celice predilekcijskega mesta v prebavilih. Sporozoiti nekaterih vrst kokcijev se nahajajo v epitelnih celicah na mestu penetracije (*E. brunetti*, *E. praecox*), medtem ko sporozoiti *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* in *E. tenella* prodrejo v epitelij kript, kjer se nato preoblikujejo v trofozoite. Trofozoiti, ki se nahajajo v citoplazemskih vakuolah epitelnih celic, imajo v začetku velika jedra z izraženimi jedrci in obliko banane, z rastjo pa dobijo ovalno obliko. Jedra trofozoitov se nato večkrat dvojno delijo in trofozoiti se preoblikujejo v nezrele shizonte. Po končani delitvi se okoli vsakega jedra izdvoji ozek del citoplazme, ki oblikuje telesce v obliki rogljiča, in tako se oblikujejo merozoiti. Zreli shizonti so nepravilne okrogle, elipsaste ali gomoljaste oblike, veliki od 10 do 60 µm. V zrelem shizontu je lahko več deset merozoitov, ki so dolgi do 16 µm in široki od 1 do 2 µm. Merozoiti zapustijo shizonte in

prodrejo v epitelne celice gostitelja, kjer se preoblikujejo v merozoite druge generacije. Po končani prvi, drugi ali večkratni shizogoniji se razvojni krog zaključi z gametogonijo. Iz merozoitov zadnje generacije shizogonije se oblikujejo ženske in moške spolno oblikovane celice ali gamete. Ženske gamete, ki so večje in jih je manj, se nato preoblikujejo v makrogamete, moške gamete, ki so številčnejše in manjše, pa se preoblikujejo v mikrogamete. Po določenem času mikrogametocid počni, sprostijo se mikrogamete, ki oplodijo makrogamete. Oblikuje se zigota, ki se obda z dvojno ovojnico in dozori v oocisto. Oociste padejo v lumen črevesja in se z iztrebki izločijo v zunanje okolje (Edgar, 1992).



Slika 1: Shematični prikaz razvojnega kroga eimerij ([www.thepoulrysite.com](http://www.thepoulrysite.com), pridobljeno 6.5.2014).

Figure 1: The coccidia parasite life cycle.

### 2.1.2 Epizootiologija kokcidioze

Kokcidioza se v intenzivni reji perutnine pojavlja zaradi stalne prisotnosti kokcidijev v okolju, tehnologije reje na globokem nastilju in ugodnih klimatskih pogojev za razmnoževanje kokcidijev. Kot intenzivno rejo se obravnava le tiste objekte, kjer je število živali večje od petsto (Mrzel, 1999). Prisotnost kokcidijev v manjšem številu je celo koristna, saj privede do razvoja imunosti, pogosto brez opaznih kliničnih znakov.

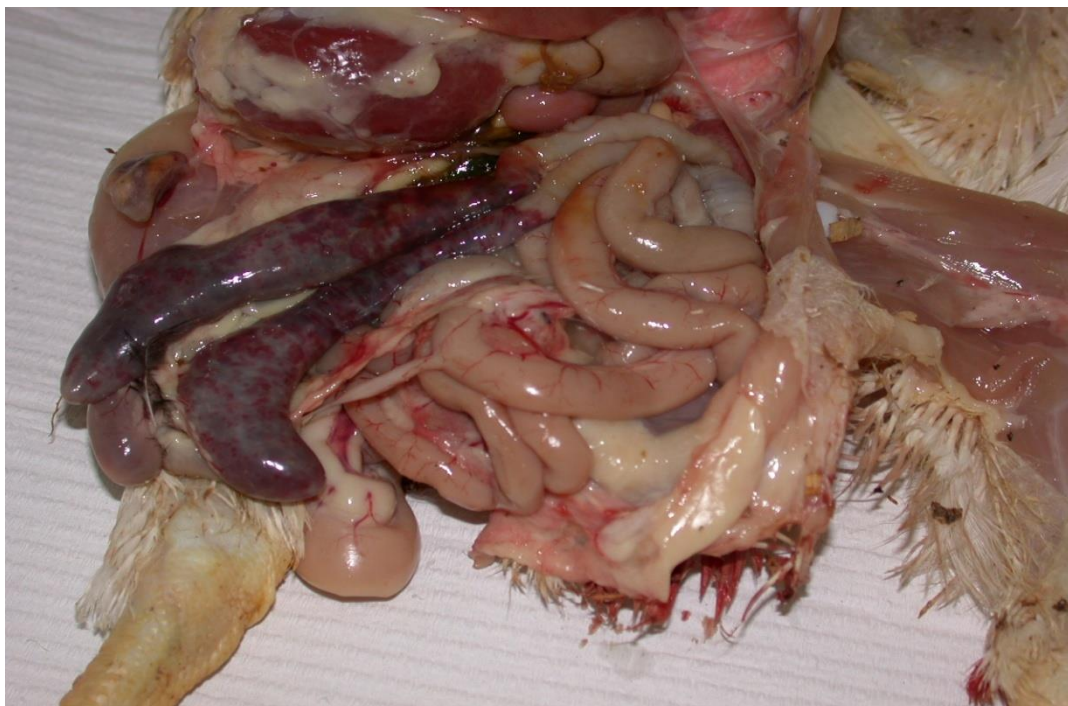
Vrste eimerij so specifične za določeno živalsko vrsto in imajo veliko reprodukcijsko sposobnost, ker se razmnožujejo z geometrijskim zaporedjem. Samo ena sporulirana oocista *E. tenella*, ki jo žival vnese v prebavila, v sedmih dneh proizvede 400.000 oocist. V zunanjem okolju oociste sporulirajo pri temperaturi od 9° C do 35° C, medtem ko predstavljajo optimalne pogoje za sporulacijo oocist temperature med 25° C in 30° C in pri več kot 90 % relativni vlagi v okolju. Sporulirane oociste lahko v zemlji preživijo tudi do 18 mesecev (Fajdiga, 2007).

Do izbruha bolezni pride, kadar živali zaužijejo večje število sporuliranih oocist. Pogoji za to so ugodne razmere za nastajanje spor, predvsem moker nastilj, visoke temperature in slabe zoohigienske razmere v hlevu. Praviloma prevladujejo mešane infekcije. Za infekcijo so dovzetnejše mlajše živali, pri starejših se namreč s časom razvije imunost. Vendar pa imune živali ob ponovni infekciji postanejo klicenosci in izločajo oociste v okolje. Izločene oociste se lahko prenašajo tudi posredno z mehaničnimi vektorji kot npr. s čevlji, obleko, transportnimi sredstvi, pa tudi z drugimi živalmi in insekti (Whiteman, 1996). Pred naselitvijo nove jate v objekt je nujno temeljito čiščenje in razkuževanje objekta in opreme. Kot najučinkovitejša so se pokazala razkužila na bazi amonijaka.

### **2.1.3 Patogeneza**

Kokcidiji poškodujejo sluznico črevesja, na poškodovanih delih se pojavijo krvavitve. Poškodovana sluznica črevesja, zlasti dvanajstnika, tako ni več sposobna izločati prebavnih sokov, posledica tega je slabša prebavljivost in resorbcija hranljivih snovi. Zaradi poškodb črevesne sluznice pogosto prihaja do kolonizacije različnih bakterij, ki še dodatno poslabšajo prognozo bolezni (slika 2).

Kokcidioza povzroča velike ekonomske izgube v intenzivni reji perutnine. Letna izguba zaradi kokcidioze je v svetu ocenjena na približno 800 milijonov dolarjev (Fajdiga, 2007).



**Slika 2:** Poškodbe črevesne sluznice perutnine, povzročitelj *E. tenella* (foto Marko Zadavec).

**Figure 2:** Damage of the intestinal mucosa poultry caused by *E. tenella*.

#### 2.1.4 Klinični znaki

Pri piščancih poteka kokcidioza v akutni ali kronični obliki. V akutni obliki se bolezen kaže kot profuzna driska, ki je lahko vodena, sluzava ali krvava. Obolele živali so potrte, neješče, zbirajo se v skupine (slika 3). Zaradi dehidracije pijejo veliko vode, pri močnejših krvavitvah se lahko pojavi tudi anemija. Kronična oblika kokcidioze poteka v blažji obliki, glavni klinični znak je driska, ki je precej milejša, kot pri akutni obliki. Živali imajo slabšo konverzijo krme in posledično zaostajajo v rasti.

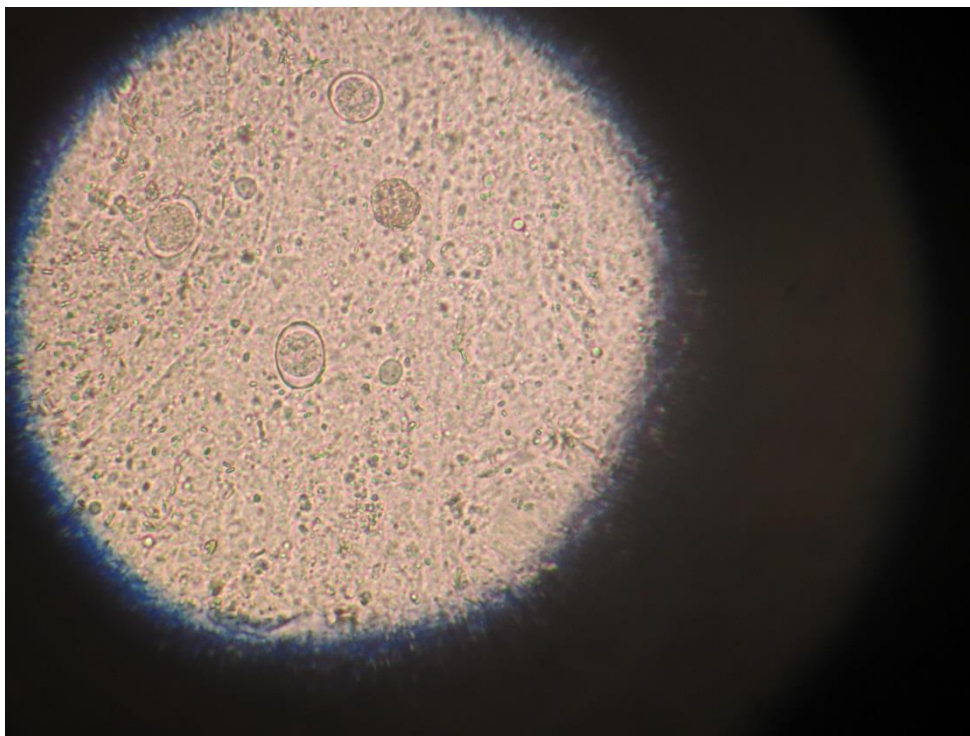


**Slika 3:** Klinična slika kokcidioze pri perutnini, (<http://www.animalhealth.bayer.com/>, pridobljeno 7. 12. 2014)

**Figure 3:** Coccidiosis in poultry, clinical signs

### 2.1.5 Diagnostika kokcidioze

Pri postavitvi diagnoze moramo upoštevati klinično sliko obolele jate, pato-histološke izvide poginulih ali žrtvovanih živali (ne zahirancev), ter ugotavljanje in določanje vrste in števila oocist v iztrebkih živali (slika 4). V zadnjih letih se v diagnostične namene uporabljajo tudi molekularne metode, ki so uporabne tudi v epizootiološke namene (Fajdiga, 2007).



**Slika 4:** Oociste v iztrebkih živali x 400; foto Olga Zorman-Rojs.

**Figure 4:** Oocysts in the faeces of animals; 400 magnification.

### **2.1.6 Preprečevanje in zdravljenje**

Zagotavljanje optimalnih zoohigienskih pogojev seveda ni zadosten ukrep, s katerim bi preprečevali razvoj kliničnih oblik kokcidioze. V zadnjih desetletjih temelji preventiva kokcidioze pri perutnini na uporabi oziroma dodajanju kokcidiostatikov v krmo, ki jo živali dobivajo skoraj celoten čas vzreje.

V začetku, to je v petdesetih letih prejšnjega stoletja, so uporabljali sulfonamide in nitrofurane, ki pa so jih kasneje, v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja, zamenjali učinkovitejši in varnejši kokcidiostatiki (Rose in sod., 1997). Med najpogosteje uporabljene kokcidiostatike spadajo danes polietrski ionoforni antibiotiki.

Pri uporabi kokcidiostatikov je zaradi varovanja zdravja ljudi potrebno dosledno spoštovati predpisano karenco.

Kadar govorimo o uspešnosti zdravljenja ali preprečevanju kokcidioze v intenzivni reji perutnine, moramo upoštevati tudi možne napake pri pripravi, proizvodnji in uporabi krmnih mešanic. S problematiko možnih napak pri proizvodnji krme smo se že zgodaj začeli ukvarjati tudi v Sloveniji. Vengušt in sodelavci (1998) so v obdobju dveh let analizirali 252 vzorcev

krmnih mešanic na vsebnost kokcidiostatikov. Ugotovili so, da je v kar četrtini analiziranih vzorcev (24,2 %) prišlo do odstopanj od vsebine, ki je bila navedena na deklaraciji. V nekaterih vzorcih kokcidiostatika sploh ni bilo, ali pa je bil uporabljen drug kokcidiostatik, kot je bil naveden na deklaraciji. Avtorji so mnenja, da jo to eden izmed pomembnejših razlogov za pojavljanje klinično manifestne in tudi subklinične kokcidioze v intenzivni reji perutnine v Sloveniji (Vengušt 2000).

Tudi rezultati 798 analiziranih vzorcev krmnih mešanic, premiksov in koncentratov na vsebnost kokcidiostatikov v obdobju 2001–2005 v Sloveniji kažejo, da je bilo neustreznih 44 oziroma 5,5 % preiskanih vzorcev. Največkrat so bili ugotovljeni ostanki kokcidiostatikov, posebno lasalocida v krmnih mešanicah, kjer se praviloma te snovi ne bi smele nahajati. Na ostanke lasalocida je bilo preiskanih 146 vzorcev, od katerih jih je bilo 12 (8,2 %) neustreznih (Tavčar Kalcher in Vengušt, 2006). Na podlagi podatkov Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, v letih 2013 in 2014 niso bila ugotovljena neskladja (za lasalocid) v analiziranih vzorcih krme za kokoši nesnice.

## 2.2 IONOFORNI ANTIBIOTIKI – KOKCIDIOSTATIKI

### 2.2.1 Delovanje ionofornih antibiotikov

Kokcidiostatike delimo na ionoforne in kemične. Ionoforji (grško ion = ion, foreomani = nositi) so spojine, ki tvorijo lipofilne, dinamično vezane reverzibilne kationske komplekse. V skupino ionofornih kokcidiostatikov spadajo lasalocid, salinomycin, monezin, narazin, maduramicin in semduramicin in jih proizvajajo bakterije iz rodu *Streptomyces*. Le maduramicin proizvajajo bakterije iz vrste *Actinomadura yumanaese*. Med kemične kokcidiostatike uvrščamo nikarbazin, robenidin, amprol, klopidol in diklazuril (Fajdiga, 2007).

Ionoforni kokcidiostatiki tvorijo v maščobi topne komplekse s kationi kalija, natrija, kalcija in magnezija in jih prenašajo skozi celične ovojnice razvojnih oblik kokcidijev. Molekule ionoforov tvorijo komplekse s kationi tako, da jih obdajo. Kisikove atome, ki so razvrščeni po hrbtenici molekule, usmerijo proti kationu, da služijo za ligande. Omejena gibljivost molekule določa velikost odprtine v sredini molekule in s tem favorizira ione s točno določenim radijem. Zaradi tega imajo ionofori visoko stopnjo ionske selektivnosti (Pressman in Fahim, 1982). Ionoforji prenašajo preko celične membrane tako monovaletne ione (natrij, kalij, rubidij), kot



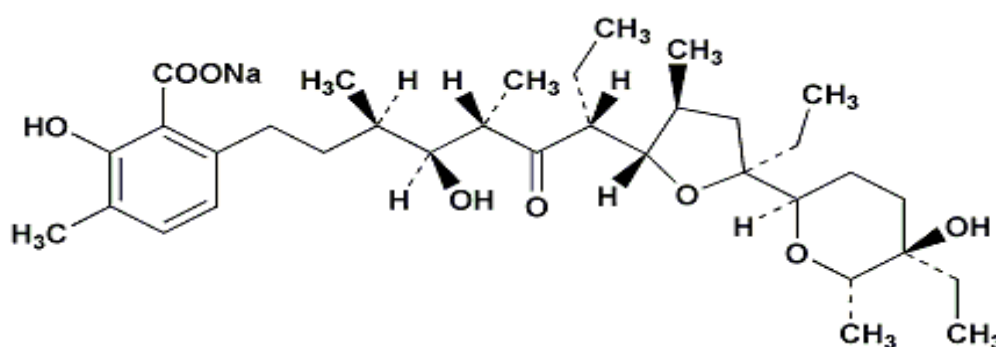
dvovalentne ione (kalcij). S tem prisilijo občutljive celice, da porabijo dodatno energijo za obnavljanje in vzdrževanje ravnovesja. Povečana poraba energije v teh celicah pomeni zanje zmanjševanje zmožnosti preživetja (Adams, 2001).

### 2.2.2 Lasalocid

Lasalocid je antibiotik, ki spada v skupino dvovalentnih polietrskih ionoforov in se uporablja v obliki natrijeve soli. Proizvaja ga bakterija *Streptomyces lasaliensis subsp. lasaliensis* in je bil leta 1951 naključno izoliran iz vzorcev zemlje iz Hyde Parka v Massachusettsu (ZDA) kot prvi izmed treh polietrskih antibiotikov (Berger in sod., 1951).

V ZDA je hranjen pod oznako ATTC 31180 (EFSA 2004). Lasalocid je sestavljen iz več različnih homolognih substanc, in sicer A, B, C, D in E. Skupna količina B, C, D in E homologov predstavlja največ 10 % celotne mase aktivne substance, torej lasalocida. Iz tega sledi, da predstavlja homolog A 90 % aktivne substance lasalocida. Ugotovljeno je, da lahko pričakujemo pri analizi lasalocid natrijeve soli 93,5 % substance A in 0,9 % substance B, po 1,5 % substanc C in D in 2,2 % substance E (Pressman in sod., 1980).

Ime IUPAC (sistematična metoda poimenovanja organskih kemičnih spojin) za lasalocid se glasi: 6-[7-[5-etil-5-(5-etil-5-hidroksi-6-metil-oksan-2-il)-3-metil-oksolan-2-il]-4-hidroksi-3,5-dimetil-6-okso-nonil]-2-hidroksi-3-metil-benzoična kislina. CAS številka je 25999-20-6 (CAS registrska številka je karakteristična številka že odkritih snovi po mednarodnem seznamu Chemical Abstract Service, ki deluje v okviru Ameriškega kemijskega društva). Zaradi razlik, ki obstajajo v molekularni strukturi med monoacidom in natrijevo soljo, se za poimenovanje lasalocida največkrat uporabljajo sinonimi za IUPAC ime in CAS oznako, ki so lasalocid natrijeva sol, lasalocid A mononatrijeva sol in X-537A (EFSA 2007, EMA 2004).



Slika 5: Strukturna formula lasalocida ( [www.chemical-report.com](http://www.chemical-report.com) , pridobljeno 6. 5. 2014)

Figure 5: Chemical structure of lasalocid

### **2.2.3 Lasalocid in njegovi pripravki**

Lasalocid učinkuje na grampozitivne mikroorganizme. V veterinarski medicini se lasalocid natrijeva sol, kot pripravek v obliki krmnega dodatka pod imenom Avatec 150G®, uporablja za preprečevanje kokcidioze pri perutnini, ki jo povzroča *Eimeria spp* (EFSA, 2004).

Avatec 150G® je krmni dodatek, ki je bil razvit že v zgodnjih sedemdesetih letih prejšnjega stoletja. Kot registriran krmni dodatek se je v Evropi začel uporabljati za piščance brojlerje leta 1983, za matične jate kokoši nesnic leta 1984 in za purane leta 1992 v skladu z Direktivo Sveta (ECC) 70/524 (Direktiva Sveta (ECC), št. 70/524).

Avatec 150G® je proizvod v obliki granul, zrn, ki vsebuje 15 % lasalocid natrijeve soli kot aktivno substanco, 2 % lecitina, 2 % sojinega olja, 0,05 % železovega oksida in koruzni škrob kot sredstvo za vezavo. Avatec 150G® je opisan kot rdeče-rjav zrnast produkt delcev, ki so v poprečju veliki okoli 500 µm.

Pri piščancih, namenjenih za pitanje, se kot krmni dodatek dodaja v krmo neprekinjeno od dneva 0 do sedmega tedna starosti v količini med 75 in 125 mg/kg krme s predpisano karenco 5 dni pred klanjem (Izvedbena Uredba Komisije (ES), št. 1014/2013).

Pri puranih se kot krmni dodatek dodaja v količini med 75 in 125 mg/kg krme do šestnajstega tedna starosti s predpisano karenco do 5 dni pred klanjem (Uredba Komisije (ES) št. 874/2010).

Kot krmni dodatek je dovoljen tudi za fazane, pegatke, prepelice in jerebice, razen nesnic v količini med 75 in 125 mg/kg krme s predpisano karenco 5 dni pred klanjem (Izvedbena Uredba Komisije (EU), št. 900/2011 in Izvedbena Uredba Komisije (EU), št. 1014/2013).

Preventivni terapevtski odmerki za piščance brojlerje so med 75 in 120 mg/kg krme; za purane, fazane, jerebice in prepelice pa 90 do 120 mg/kg krme.

Mehanizem delovanja lasalocida je podoben, kot je pri ostalih ionoforih. Lasalocid deluje najbolj uničujoče na proste merozoite in to že pri nizkih koncentracijah in v kratkem času. Mehlhorn in sodelavci (1983) so ugotovili, da ostanejo intracelularne faze kokcidijev, ki se nahajajo v nepoškodovanih celicah gostitelja, nepoškodovane verjetno zato, ker ionoforni antibiotiki ne morejo prodreti v te celice. V primeru, da so šizonti prisotni v poškodovanih celicah gostitelja, jih polietrski ionoforni antibiotiki poškodujejo, ne pa tudi uničijo. Lasalocid kljub kumulativni sposobnosti selektivno deluje na sporozoite in le redko poškoduje vitalne celice gostitelja (Edgar, S.A. in Flanagan, E.G., 1974).

V ZDA je lasalocid natrijeva sol registrirana kot kokcidiostatik in pospeševalec rasti pri perutnini, ovcah, govedu in kuncih. V državah tretjega sveta pa je dovoljen tudi kot pospeševalec rasti pri ovcah, govedu in kuncih, vendar so dovoljene količine bistveno manjše kot tiste, ki se uporabljajo za preventivo kokcidioze pri perutnini. Za govedo in ovce je dovoljena količina, ki se dodaja krmi 33 mg/kg krme, za kunce pa med 68-113 mg/kg krme za zdravljenje kokcidioze jeter (EFSA, 2007).

V Avstraliji je prav tako registriran kot kokcidiostatik za perutnino in pospeševalec rasti za govedo.

V Kanadi je lasalocid natrij dovoljen kot kokcidiostatik pri piščancih (do 105 mg/kg krme) in puranih (do 100 mg/kg krme) ter kot pospeševalec rasti pri govedu (do 200 mg lasalocid natrija na glavo živali na dan) (<http://www.inspection.gc.ca/animals/feeds/medicating-ingredients/mib/mib-66/eng/1331062251297/1331062327299>, pridobljeno 24. 5. 2014).

V preglednici 1 so predstavljene MRL vrednosti za lasalocid v državah izven EU (R. Young , C. Nunan 2004).

**Preglednica 1:** Vrednosti MRL za lasalocid v različnih državah v µg/kg

**Table 1:** The values of the MRLs for lasalocid in different countries in µg/kg.

	<b>Avstralija</b>	<b>Kanada</b>	<b>Nova Zelandija</b>	<b>ZDA</b>
<b>Jetra goveda</b>	vrednost ni določena	650	ni podatkov	ni podatkov
<b>Jetra piščancev</b>	700	vrednost ni določena	5000	400
<b>Meso piščancev</b>	50	vrednost ni določena	200	ni podatkov
<b>Koža, maščoba piščancev</b>	1200	350	200	1200
<b>Jajca</b>	50	vrednost ni določena	ni podatkov	ni podatkov

Lasalocid natrijeva sol in vsi ostali polietrski antibiotiki se ne uporabljajo v humani medicini.

Zaradi varovanja zdravja ljudi in zaščite potrošnikov so za lasalocid določene največje dopustne vsebnosti farmakološko aktivnih substanc (vrednosti MRL) za posamezne vrste tkiva pri perutnini, ki se uporabljajo za prehrano ljudi (Izvedbena Uredba Komisije (EU) št. 1277/2014, z dne 1. decembra 2014 o spremembi Uredbe Komisije (EU) št. 37/2010 o farmakološko aktivnih snoveh in njihovi razvrstitvi glede mejnih vrednosti ostankov v živilih živalskega izvora, glede snovi lasalocid). Vrednosti so predstavljene v preglednici 2.

**Preglednica 2:** Največje dopustne vsebnosti zaostankov lasalocida v tkivih perutnine, določene z Izvedbeno Uredbo 1277/2014.

**Table 2:** The maximum residue levels of lasalocid in the poultry tissues according to Implementing Regulation 1277/2014/EC.

Farmakološko aktivna substanca	Kazalec zaostankov	Vrsta živali	MRL	Vrsta tkiva	Opombe*
Lasalocid natrijeva sol	lasalocid A	perutnina	60 µg/kg	mišično tkivo	Prepovedana uporaba za kokoši nesnice, ki proizvajajo jajca namenjena za prehrano ljudi
			300 µg/kg	koža in maščobno tkivo	
			300 µg/kg	jetra	
			150 µg/kg	ledvice	
			150 µg/kg	jajca	

Z izvedbeno Uredbo Komisije (Izvedbena Uredba Komisije (ES) št. 86/2012 o spremembi Priloge k Uredbi (EU) št. 37/2010 o farmakološko aktivnih snoveh in njihovi razvrstitvi glede mejnih vrednosti ostankov v živilih živalskega izvora v zvezi s snovjo lasalocid), so določene tudi mejne vrednosti za meso, jetra, maščobo in ledvice goveda, razen pri živali, katerih mleko je namenjeno za prehrano ljudi. Vrednosti so predstavljene v preglednici 3.

**Preglednica 3:** Največje dopustne vsebnosti zaostankov lasalocida v tkivih goveda, določene z Uredbo 86/2012.

**Table 3:** The maximum residue levels of lasalocid in the cattle tissues according to Regulation 86/2012/EC.

Farmakološko aktivna substanca	Kazalec zaostankov	Vrsta živali	MRL	Vrsta tkiva	Opombe*
Lasalocid natrijeva sol	lasalocid A	govedo	10µg/kg	mišičje	Ni za uporabo pri živalih, katerih mleko je namenjeno za prehrano ljudi
			20µg/kg	maščevje	
			100µg/kg	jetra	
			20µg/kg	ledvice	

Priporočila in standardi za nadzor nad ostanki veterinarskih zdravil v živilih se pripravljajo tudi širše v delovnih skupinah Codexa Alimentarius, ki delujejo v okviru Organizacije združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (FAO) (Ellis, 2008).

Zaradi tehnično neizogibnega pojavljanja sledi kokcidiostatikov, ki so posledica nenamernega navzkrižnega onesnaženja krme v proizvodnem procesu, je bilo nujno določiti tudi mejne

vrednosti v živilih, ki se uporabljajo za prehrano ljudi in izvirajo od živali, za katere lasalocid ni dovoljen kot krmni dodatek. Enotne mejne vrednosti za živila, ki izvirajo od neciljnih živali, je bilo potrebno sprejeti zaradi različnih pristopov držav članic pri obravnavanju problematike nenamernega navzkrižnega onesnaženja s ciljem, da se zagotovi ustrezno delovanje notranjega trga in varovanje javnega zdravja.

To je bilo storjeno z Uredbo Komisije (EU) št. 124/2009 z dne 10. februarja 2009. Uredba določa mejne vrednosti kokcidiostatikov v živilih, ki izvirajo od neciljnih živali in so posledica nenamernega in neizogibnega prenosa teh snovi s krmo. Uredba prav tako določa postopek ukrepov, kadar se ugotovi prisotnost onesnaževala pod dopustno mejno vrednostjo. V teh primerih mora pristojni nadzorni organ opraviti dodatne preiskave za potrditev, da je prisotnost ostanka ugotovljenega kokcidiostatika posledica neizogibnega prenosa v krmo zaradi tehnološkega procesa in ne zaradi nezakonite uporabe kokcidiostatika. Mejne vrednosti so bile postavljene na podlagi mnenj EFSE o tveganjih za zdravje živali in javno zdravje, kjer je bila za vsak kokcidiostatik, ki je registriran kot dovoljen krmni dodatek, pri oceni upoštevana 2 %, 5 % in 10 % domnevna stopnja prenosa od najvišjih dovoljenih vrednosti, ki se lahko dodajajo krmni (za lasalocid je ta vrednost 125 mg/kg krme). Uredba 124/2009 in Uredba 610/2012 tako določata dopustne mejne vrednosti za lasalocid v mleku, jetrih in ledvicah ter drugih živilih živalskega izvora, ki izvirajo od neciljnih živali (preglednica 4).

**Preglednica 4:** Dopustne vrednosti lasalocida v živilih neciljnih živali, določene z Uredbe Komisije, št. 124/2009 in Uredbo Komisije št. 610/2012 .

**Table 4:** The maximum residue values for lasalocid in food of non-target animals laid down by Commission Regulation No. 124/2009 and Commission Regulation No. 610/2012.

Farmakološko aktivna substanca	Živila živalskega izvora razen perutnine	Največja vsebnost v $\mu\text{g}/\text{kg}$ mokre teže
Lasalocid natrij	mleko	1
	jetra	50
	ledvice	20
	druga živila	5

#### 2.2.4 Fizikalno - kemijske lastnosti lasalocida in stabilnost na temperaturo in pH

Molekularna teža lasalocida je 590, 8 g s formulo  $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_8$ . Molekularna teža lasalocid natrijeve soli je 612, 8 g, topnost v vodi pri 30 °C je 1,06 g/l in porazdelitveni koeficient med vodo in oktanolom  $K_{ow}$  (ang. log octanol/water partition coefficient) znaša med 1,4 in 2,3

(EFSA, 2007). Porazdelitveni koeficient je merilo za porazdelitev učinkovine med lipofilno stacionarno fazo in vodno fazo brez dodatkov organskih topil.

Splošna stabilnost molekule: Lasalocid je stabilen pri sobni temperaturi in pH - vrednosti med 5,5 in 7,0. Izpostavljenost pH - vrednosti 10,0 pri 80° C kaže na 30 % izgubo učinkovitosti v 48 urah, pri pH - vrednosti 12,0 pa je nestabilen in izgublja učinkovitost delovanja v manj kot 8 urah (Rose in sod.,1997).

Stabilnost v krmnih mešanicah: Učinkovitost registriranega pripravka »Avatec« v krmnih mešanicah, ki so vsebovale holine in minerale v sledovih se je zmanjšala za 10 % v enem mesecu skladiščenja in za 14 % v treh mesecih skladiščenja. Koncentracija aktivne substance lasalocid natrija v samem pripravku »Avatec« pa se je zmanjšala za 1 % po enem mesecu skladiščenja in za 5 % po treh mesecih skladiščenja (EFSA, 2004).

Stabilnost v živilih: Lasalocid je odporen na visoko temperaturo v enostavnih vodnih raztopinah v nevtralnem okolju. Ostanke lasalocida v živilih so stabilni na segrevanje v nevtralnem in kislem okolju, nestabilni pa v bazičnem okolju. Fiziološka vrednost pH mišičnega tkiva piščancev je 5,7, jajčnega beljaka med 6,0 in 6,8 in jajčnega rumenjaka 9,0. Pri poskusu s kuhanjem in pečenjem mišičnega tkiva piščancev je bilo ugotovljeno, da so bili ostanki lasalocida stabilni na kuhanje pri vseh temperaturah višjih od 100° C tri ure; po treh urah so bili ostanki lasalocida stabilni pri pH-vrednosti 5,5 in 7,0. Pri poskusu pečenja jajc je bilo ugotovljeno, da je izguba lasalocida pri pripravi jajčne omlete 27 %, pri pripravi umešanih jajc pa 59 % (Rose, in sod., 1997).

Lasalocid je nestabilen v sončničnem olju. Pri temperaturi 180° C je razpolovna doba petnajst minut, prav tako je nestabilen pri pH-vrednosti 10, 0, kjer je njegova razpolovna doba trideset minut (Rose in sod., 1997).

### **2.2.5 Antibakterijsko delovanje lasalocida**

Lasalocid natrijeva sol deluje selektivno na grampozitivne bakterije iz vrst *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* in *Staphylococcus spp.*, v koncentracijah med 0,06 in 4,0 mg/l, medtem ko je večina bakterij iz družine *Enterobacteriaceae* naravno odporna. Različne študije, opravljene in vitro kažejo, da so gramnegativne bakterije odporne na ionofore, vključno z lasalocidom. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) lasalocida za seve *Salmonella Typhimurium*,

*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Acinetobacter spp.* je nad 256 mg/l (Butaye in sod., 2000).

Zaradi pomanjkanja podatkov ni možno podati ocene vpliva lasalocida na kakovost proizvodov iz perutninskega mesa s stališča senzorične, hranilne vrednosti in vpliva na tehnološki proces. Sklepa pa se, da ob upoštevanju pravil predpisane uporabe in načel dobre proizvodne prakse lasalocid ne vpliva na kakovost končnih proizvodov (EFSA, 2004).

### **2.2.6 Postopek pridobitve dovoljenja za krmne dodatke**

Za vsak kokcidiostatik je potrebno skladno z Direktivo Komisije št. 79/2001 pripraviti dosje za pridobitev dovoljenja za uporabo kokcidiostatika kot krmnega dodatka. Pri tem je potrebno upoštevati dvoje: merila za oceno tveganja za potrošnika, ki bi lahko nastala kot rezultat porabe hrane, ki vsebuje ostanke dodatka ali njegovih metabolitov ter oceno tveganja škodljivosti vpliva dodatka na okolje. Vpliv dodatka na okolje je lahko neposreden, lahko je rezultat učinka proizvodov, ki iz njega izhajajo, ali pa pride v okolje z izločki živali. Neprekinjena uporaba kokcidiostatikov skozi daljše časovno obdobje in izboljšane genetske sposobnosti živali lahko spremenijo dovzetnost *Eimerie spp.* na delovanje kokcidiostatikov. Zato je v Direktivi zahteva, da morajo biti količine, ki se dodajajo krmi, določene na podlagi najnovejših znanstvenih dognanj, kar so pri ponovnem ovrednotenju preparata »Avatec« upoštevali tudi strokovnjaki Znanstvenega odbora za prehrano živali pri Evropski agenciji za varnost hrane.

Rezultati predhodnih študij so pokazali, da je preventivno delovanje »Avateca« na kokcidiozo pri piščancih brojlerjih in matičnih jatah kokoši nesnic učinkovito pri odmerku lasalocid natrija med 75 in 125 mg/kg krme (EFSA, 2004). Rezultati študije, ki je bila opravljena pri piščancih brojlerjih pri tehnologiji talne reje, pa kažejo najbolj učinkovito delovanje lasalocida pri odmerku 90 mg/kg krme. Za matične jate kokoši se je kot najbolj učinkovit izkazal režim konstantnega dodajanja lasalocida v krmo v odmerku 90 mg/kg krme (EFSA, 2004).

Dovoljenja za krmne dodatke je potrebno obnavljati na določeno časovno obdobje.

### **2.2.7 Pojavljanje odpornosti na kokcidiostatike**

Ker se pri vsaki neprekinjeni uporabi antibiotikov v daljšem časovnem obdobju srečamo s pojavom odpornosti ciljnih vrst mikroorganizmov, podajamo nekaj informacij tudi za eimerije.

Peeters in sodelavci (1994) opisujejo študijo, v kateri so uporabili najbolj pogoste seve eimerij (*E. acervulina*, *E. maxima* in *E. tenella*), ki so bili izolirani iz 122 brojlerskih farm piščancev v Belgiji. Na farmah se je za preprečevanje kokcidioze najpogosteje uporabljal »shuttle« program. Na farmah niso bili ugotovljeni klinični znaki kokcidioze. Izolirane seve (146 sevov *E. acervulina*, 65 *E. maxima* in 88 *E. tenella*) so testirali na sedemnajst parametrov občutljivosti. Rezultati so pokazali, da je prisotna splošna odpornost, zato posamezni ionoforni pripravki ne morejo učinkovito zavirati rasti izolatov eimerij. Kot najbolj učinkoviti so se pokazali lasalocid, narazin, maduramicin in salinomicin, medtem ko je bil monensin najmanj učinkovit.

Iz Nemčije prihajajo podatki o dveh opravljenih študijah, ki proučujeta pojav rezistence na kokcidiostatike. Prva opisuje ugotavljanje občutljivosti desetih različnih naravno pridobljenih sevov eimerij, kjer ugotavljajo, da kar devet proučevanih sevov kaže multiplo rezistenco, medtem ko je bila navzkrižna rezistenca ugotovljena pri petih izoliranih sevih (Stephan in sod., 1997). V drugi raziskavi so primerjali učinkovitost različnih krmnih dodatkov s pričakovano rezistenco glede na uporabo v preteklosti. Sevi eimerij so bili prav tako izolirani iz naravnega okolja. V raziskavo je bilo v treh zaporednih poskusih vključeno 100.000 piščancev brojlerjev. Rezultati so pokazali, da so bile živali v prvem poskusu odporne na kokcidiostatike, ki so jih s krmo prejemale v preteklosti (Dauguschies in sod., 1998).

Novejša študija na tem področju prihaja iz Nizozemske in opisuje pojav rezistence na eimerijo pri perutnini v letih 1996, 2000 in 2001 (Peek in Landman, 2003). Incidenca kokcidioze (*E. acervulina*) pri piščancih brojlerjih farmske reje, ki so bili vključeni v monitoring, je bila 70 % v letu 1996, 91 % v letu 2000 in 73 % v letu 2001. Ugotovljeno je bilo, da je *E. acervulina* bolj ali manj odporna na različne vrste dodanih kokcidiostatikov v celotnem časovnem obdobju. Kljub temu pa se klinična oblika bolezni ni pojavila. Avtorji zaključujejo, da se je pojavu rezistence mogoče izogniti z izmenično uporabo različnih vrst kokcidiostatikov (Peek in Landman, 2003).

V Sloveniji je bilo pri proučevanju rezistence na kokcidiostatik salinomicin pri sevih *E. maxima*, *E. acervulina* in *E. tenella* pri piščancih brojlerjih ugotovljeno, da preiskovani izolati niso bili rezistentni na salinomicin (Fajdiga, 2007). Zaradi pogostega pojava rezistence kokcidiijev, se v praksi različni kokcidiostatiki uporabljajo izmenično v različnih programih. V rotacijskem programu se kokcidiostatiki po določenem času redno menjavajo, v »shuttle«



programu pa se dva kokcidiostatika menjata v času pitanja piščancev brojlerjev. »Shuttle« program lahko obsega izmenjavo dveh ionofornih kokcidiostatikov ali ionofornega in kemičnega kokcidiostatika (Fajdiga, 2007).

## 2.3 ŠTUDIJE VARNOSTI UPORABE LASALOCIDA PRI CILJNIH ŽIVALIH

### 2.3.1 Metabolizem lasalocida in tolerančni testi pri ciljnih živalih

Metabolizem lasalocida so proučevali v poskusu, ki ga opisuje Lehel s sodelavci (1995). Piščanci so štiriintrideset dni v krmi najprej prejeli nevezan lasalocid natrij v koncentraciji 75 in 125 mg/kg krme. Temu je sledilo enaindvajsetdnevno krmljenje s krmo, ki ji je bil dodan radioaktivno označen (markiran) lasalocid v enakih koncentracijah.

Rezultati poskusa so pokazali, da je bila stabilna vrednost lasalocida v krvi dosežena po treh dneh. V štiriindvajsetih urah se je z iztrebki izločilo 92 % zaužitega lasalocida, v osemindvajsetih urah se je izločilo 95 % zaužitega lasalocida. Vrednosti ostankov lasalocida v jetrih so se gibale med 15 % (po dveh urah) in narasle na 80 % po petdnevni karenci. Zato avtorji sklepajo, da so se vezani ostanki lasalocida kasneje vgradili v endogene substance jeter (Lehel in sod., 1995; Mitrovic in Schildknecht, 1974).

Novejši podatki izhajajo iz študije, pri kateri so piščancem sedem dni (dvakrat na dan) s kapsulami dajali radioaktivno označen lasalocid v koncentraciji, ki je ustrezala vsebnosti 125 mg/kg krme. Živali so bile žrtvovane pred začetkom poskusa, ter prvi, tretji, peti in sedmi dan poskusa. Za ugotavljanje metaboličnega ravnovesja so bili analizirani iztrebki živali, ki so jih zbirali vseh sedem dni poskusa. Rezultati analiz so pokazali, da količina skupnega radioaktivno označenega lasalocida v iztrebkih pada prvih sedem dni po vnosu in znaša približno 90 % dnevnega vnosa lasalocida. Prav tako je bilo ugotovljeno, da predstavlja nespremenjen (nevezan) lasalocid pri moških živalih 74 % in pri ženskih 77 % od vseh prisotnih ostankov radioaktivno označenega lasalocida v iztrebkih, medtem ko je bila vrednost ostalih metabolitov manjša kot 10 % (Mc Lellan in sod., 2003).

Ti rezultati so neskladni z rezultati, ki jih opisujejo Lehel in sodelavci (1995), kjer je bilo v iztrebkih ugotovljeno le 12 % nespremenjenega lasalocida.

V študijah, ki so bile opravljene na matičnih jatah kokoši nesnic in piščancih, sta obe skupini perutnine prejemale krmo brez dodanega lasalocida in krmo z dodatkom v koncentraciji 125, 375 in 625 mg/kg. Proučevali so različne parametre, in sicer prirast, težo in kakovost jajc, debelino jajčne lupine, fertilitnost, valilno sposobnost in teratološke spremembe na emrijih. Opravljene so bile tudi histopatološke raziskave kostnega mozga živali.

Rezultati so pokazali, da uporaba maksimalno dovoljene koncentracije ni vplivala na razvojno sposobnost živali, padanje ali naraščanje telesne mase, konverzijo krme in spremembo hematoloških parametrov. Pri visokih koncentracijah lasalocida krmi (375 mg/kg in 625 mg/kg) pa je bil ugotovljen povečan pogin, motnje v rasti in razvoju, zmanjšana sposobnost izkoriščanja krme in povečano izločanje iztrebkov (EFSA, 2004).

## 2.4 TOKSIČNO DELOVANJE LASALOCIDA PRI CILJNIH ŽIVALIH

### 2.4.1 Piščanci in purani

V poskusu, ki ga navaja EFSA (EFSA, 2007), so različne kategorije perutnine (piščance brojlerje, matične jate kokoši in kokoši v kletkah) šestnajst tednov krmili s krmo, ki so ji dodali 0, 125, 375 in 625 mg/kg lasalocida. Na preiskovanih vzorcih žrtvovanih živali so bile opravljene patološke, hematološke in histološke analize. Rezultati so pokazali, da pri krmljenju s krmo, ki je vsebovala 125 mg/kg lasalocida niso opazili vplivov na maso živali, konverzijo krme, večji pogin ali povečano izločanje iztrebkov.

Pri krmljenju s krmo, ki je vsebovala 375 mg/kg lasalocida, se je pri vseh skupinah živali pokazalo zmanjšanje prirasta, slabša konverzija krme, povečano izločanje iztrebkov in povečan pogin šestinpetdeseti in štiriinosemdeseti dan poskusa. Pri živalih, ki so dobivale 625 mg lasalocida na kg krme, je bil ugotovljen visok pogin in slabo splošno stanje.

Pri matičnih jatah kokoši nesnic dodatek lasalocida v koncentraciji 125 ali 375 mg/kg ni vplival na plodnost in valilnost jajc. Prav tako niso bili ugotovljeni znaki toksičnega delovanja pri piščancih, ki so se izvalili iz takšnih jajc.

Pri piščancih brojlerjih, ki so v poskusu dobivali lasalocid v obliki oralnih kapsul v odmerkih med 37 mg/kg in 317 mg/kg t.m., so bili ugotovljeni naslednji znaki toksičnega delovanja: letargija, povešana krila in nezmožnost gibanja. Pogin je nastopil pretežno po štiriindvajsetih urah. Preživele živali so bile shujšane in dehidrirane. Patološki izvidi so pokazali povečana

ledvica, vranico in jetra. V organih so bila ugotovljena diseminirana področja nekrotičnih sprememb.

Na podlagi podatkov te študije je bila določena LD<sub>50</sub> za piščance, ki znaša med 59 mg/kg in 84 mg/kg t.m. (EMA, 2005; EFSA, 2007).

Subkronično delovanje lasalocida so ugotavljali z dodajanjem le-tega krmi do koncentracije 125 mg/kg. Ta koncentracija se je pokazala kot izredno tolerantna za živali, saj niso bili ugotovljeni škodljivi vplivi na njihovo zdravje. Enodnevni piščanci so devet tednov dobivali krmo z dodatkom lasalocida v koncentraciji od 75 do 375 mg/kg krme. Rezultati so pokazali, da do dodatka v koncentraciji 225 mg/kg krme ni razlik glede pogina, t.m., konverzije krme ali hematoloških parametrov (EFSA, 2007).

Lodge in sodelavci (1988) opisujejo poskus na puranih, ki so ga opravili na štiridesetih enodnevnih puranih Sun Valley SWII. Ena skupina je prejela krmo z dodatkom lasalocida (375 mg/kg) in druga krmo brez lasalocida. Poskus je trajal šestnajst tednov. Študija je pokazala, da pri puranih ni bilo opaziti nobenih kliničnih znakov. Prav tako rezultati biokemijskih preiskav, ki so bile opravljene dvanajsti teden poskusa, niso pokazali razlik v vrednostih hematoloških in biokemičnih parametrov pri živalih, ki so dobivale lasalocid in tistih, ki so dobivale krmo brez lasalocida.

## 2.5 TOKSIČNOST LASALOCIDA ZA NECILJNE VRSTE ŽIVALI

Po podatkih iz literature so konji občutljivi na ionoforne kokcidostatike in sicer najbolj na salinomycin, kjer je letalna doza že pri odmerku nižjem od 0,3 mg/kg t.m.; nekoliko manj pa so občutljivi na lasalocid, kjer poročajo o letalni dozi 15 mg/kg t.m. (Nicpon s sodelavci (1997).

Hanson in sodelavci (1981) opisujejo poskus, v katerem je skupina konjev posamezno prejela naraščajoče odmerke lasalocida od 5 do 30 mg/kg t.m. na dan. Na podlagi rezultatov poskusa so avtorji zaključili, da znaša povprečna letalna doza lasalocida za konje med 15 in 21 mg/kg t.m. Klinični znaki intoksikacije pri konjih so depresija, progresivna ataksija, pareza, paraliza, anoreksija, dispnea, zanašanje predvsem v zadnjem delu trupa in ležanje, prizadeta je tudi srčna mišica (Matsuoka, 1976; Kronfeld, 2002; EMA, 2004).

Pri govedu se znaki toksičnega delovanja lasalocida pojavijo pri višjih odmerkih (50 in 100 mg/kg t.m.) in sicer mišični tremor, tahikardia in atonia vampa, ugotovljene so tudi spremembe

parametrov krvne slike. Živali so poginile v roku enega do dvaindvajset dni (Galitzer in sod., 1986).

Dodajanje lasalocida v krmo za ovce v koncentraciji 100 mg/kg (103 dni) ne vpliva na prirast, in konverzijo krme (Foreyet in sod., 1981). Dodajanje lasalocida v krmo za telice (54 mg/kg) dokazano vpliva na boljše pridobivanje telesne mase in povečano konverzijo krme, niso pa ugotovili sprememb v kakovosti zaklanih trupov (Delfino in sod., 1988).

Pri poskusu na pašnih živalih, ki so dobivale lasalocid, ki je tudi do pet krat presegal največje dovoljene vrednost za govedo, ki je 200 mg lasalocida na žival na dan, pa škodljivi učinki delovanja lasalocida niso bili ugotovljeni (Kiser in sod., 1986).

Rezultati poskusov, opravljenih pri kravah v laktaciji in med presušitvijo, so pokazali da lasalocid ne vpliva na koncepcijo in stopnjo brejosti, prav tako niso bile ugotovljene spremembe glede velikosti ploda in porodne teže telet. Pri kravah je bila ugotovljena izboljšana kondicija in masa živali ter zmanjšanje premora med porodom in prvim estrusom po porodu (Fleck in sod., 1985; Goehring in sod., 1989; Hopman in Weber, 1986; Kieser in sod., 1986; Wagner in sod., 1984).

Pri teletih je prišlo do pogina pri odmerkih lasalocida med 5 in 8 mg/kg t.m.. Patoanatomske preiskave so pokazale spremembe na srčni mišici (krvavitve v epikardu, rumene obloge na srčni mišici in krvne strdke) (Blancard in sod., 1993, EMA, 2004).

Dodajanja lasalocida v krmo za svinje ne vpliva na reproduktivno sposobnost živali. Dodajanje lasalocida ni vplivalo na povečanje telesne mase živali, prav tako ni bil ugotovljen vpliv na estrus. Edini opazen učinek, ki ga pripisujejo lasalocidu, je visoko število živih pujskov štirinajst dni po porodu in nizka vsebnost maščobe v kolostrumu (Holzgraefe in sod., 1986; Haydon in Hale, 1989).

Toksičen odmerek lasalocida za kunce LD<sub>50</sub> je 40 mg/kg t.m.. Pri količini 2,0 mg/kg t.m. opisujejo povečano število zgodnjih embrionalnih smrti, zmanjšano maso plodov, povišano število živali z motnostjo roženice in nepopolno osifikacijo. NOEL pri kuncih za maternalno in fetalno toksičnost je 0,5 mg lasalocida na kg t.m. na dan (EMA, 2004).

Intravenozna aplikacija lasalocida pri psih v odmerku 1,0 mg/kg t.m. povzroča motnje v funkciji srca in koronarnega obtoka ter motnje v lokalnem krvnem obtoku. (Hanley in sod., 1975).

Pri naključnem zaužitju komercialno pripravljene krme, ki je vsebovala 200 mg lasalocida/kg krme (ocenjujejo, da so psi zaužili približno 5 mg/kg t.m. lasalocida), so živali 12 ur po zaužitju krme kazale znake splošne oslabelosti in živčne motnje, nekaj živali je poginilo, ostalim se je zdravstveno stanje izboljšalo v enem do štirih dneh, odvisno od stopnje prizadetosti. Ugotovljeni klinični znaki so bili: pareza in hiporefleksija, splošni živčni znaki in povišana telesna temperatura, dispnea, ohlapnost jezika in hiperestezija (Segev in sod., 2004).

Espino s sodelavci (2003) pa poroča o dogodku, ko so psi naključno zaužili krmo za piščance, ki je vsebovala 150 mg lasalocida/kg krme. Pri psih so bili ugotovljeni živčni znaki. Pri kliničnem pregledu živali je bila ugotovljena depresija, blaga dehidracija in tahikardija.

O vplivu lasalocida na ribe najdemo v literaturi malo podatkov. Kljub temu je EFSA pripravila mnenje o toksičnosti lasalocida za vodne organizme. Akutna toksičnost za ribe vrste *Brachydanio rerio* in *Lepomis macrochirus* je 2,5 mg in 3,6 mg/l (96 ur LC<sub>50</sub>) in za okrasne zlate ribice 6,0 mg/l (72 ur LC<sub>50</sub>) (EFSA, 2007).

Krma za ribe je redko izpostavljena nenamerni navzkrižni kontaminaciji s kokcidiostatiki, ker se običajno pripravlja v ločenih obratih. Krmo za ribe je namreč potrebno hitro prilagajati tako glede strukture, kot vsebnosti maščob in ostalih hranilnih snovi različnim vrstam in starosti ribje populacije.

## 2.6 ŠTUDIJE KRONIČNE TOKSIČNOSTI PRI LABORATORIJSKIH ŽIVALIH

Študije kronične toksičnosti so bile opravljene pri podganah in psih in so trajale dve leti. V poskus so bile vključene živali obeh spolov.

Podgane so s krmo dobivale lasalocid v koncentraciji 10, 35 in 120 mg/kg, kar ustreza vnosu približno 0,5, 1,8 in 6,2 mg/kg t.m. pri samcih in pri samicah 0,6, 2,2 in 8,1 mg/kg t.m. Živali so dobivale lasalocid en teden pred brejostjo in v času laktacije.

Rezultati študij so pokazali, da nobena koncentracija lasalocida ni vplivala na preživetje, prav tako ni bilo opaznih razlik v povprečni masi in porabi krme med poskusno in kontrolno skupino. Pri nobeni skupini niso bile ugotovljene živčne motnje, očne spremembe, klinični znaki ali povečana pojavnost vidnih tumorjev in vozličev (EFSA, 2004).

Pri višji koncentraciji (35 in 120 mg/kg) je bilo pri obeh spolih ugotovljeno povečanje jeter in povečana ščitnica, niso pa bile ugotovljene histološke spremembe na obeh organih. Iz študije izhaja, da lasalocid nima kancerogenih lastnosti, ker tumorozne spremembe niso bile ugotovljene pri nobeni dodani koncentraciji lasalocida v krmi. NOEL so določili pri 0,5 mg/kg t.m. na dan za samce in 0,6 mg/kg t.m. na dan za samice.

Pri miših in podganah, ki so s krmo dve leti dobivale lasalocid v koncentraciji 0, 10, 35 in 120 mg/kg, niso bili ugotovljeni nobeni klinični znaki ali spremembe na očeh, prav tako ni bil ugotovljen vpliv na pogin, telesno maso in porabo krme.

Pri poginjenih ali evtanaziranih mišjih samicah je bila ugotovljena povečana pojavnost limfosarkomov v skupinah, ki so prejemale lasalocid v nizkih in visokih koncentracijah (EMA, 2004).

Psi so dve leti prejemale lasalocid s hrano v koncentracijah 10, 35 in 180 mg/kg hrane, kar je ustrezalo dnevni vnosu v količini 0,3 mg, 1 mg in 6 mg/kg t.m.

Pri živalih so opazovali klinične znake, funkcije centralnega živčnega sistema s preverjanjem refleksov, oftalmološke preiskave, EKG, hematološke in urinske preiskave ter porabo krme. Pri vseh preživelih živalih je bila opravljena patoanatomska in histološka diagnostika.

Kljub ugotovljenim živčnim kliničnim znakom niso ugotovili nobenih histoloških sprememb centralnega živčnega sistema. Zaradi zmanjšane mase prostate pri samcih, krmljenih s hrano, ki je vsebovala 180 mg lasalocida na kilogram (5 mg/kg t.m.), stalno prisotne povečane aktivnosti serumske alkalne fosfataze in zmanjšane apetita so določili NOEL pri 35 mg lasalocida na kg hrane, kar je enako približno 1 mg/kg t.m. pri obeh spolih. Iz tega lahko sklepamo, da so podgane bolj občutljive na lasalocid kot psi. (EFSA, 2004; EMA 2004).

## 2.7 FARMAKOKINETIKA IN METABOLIZEM LASALOCIDA IN NJEGOVO NALAGANJE V TKIVIH

### 2.7.1 Farmakokinetika pri ciljnih živalskih vrstah (piščanci in purani)

Opravljene so bile številne študije, ki so ugotovljale nalaganje, dinamiko in izločanje lasalocida v različnih tkivih piščancev in puranov.

Pri piščancih, ki so šestnajst dni dobivali s krmo neoznačen lasalocid v koncentraciji 75 mg/kg krme nato, pa so še tri dni radioaktivno označen lasalocid (s  $C^{14}$ ) v obliki kapsul, v odmerkih po 5 mg/kg t.m. je bila ugotovljena največja absorbcija označenega lasalocida v plazmi v dveh urah po zadnji aplikaciji. Bila je 5,62  $\mu\text{g/ml}$ .

Analize tkiv so pokazale, da je bilo največ radioaktivno vezanega lasalocida v jetrih (10,3 mg/kg), v ledvicah 3,0 mg/kg, v maščobi 1,4 mg/kg in v mišičnem tkivu 0,76 mg/kg. Z iztrebki se je izločilo 95,6 % celotnega odmerka. Nadaljnje analize iztrebkov so pokazale, da se je pretežno izločil lasalocid A (EFSA, 2007).

O dinamiki izločanja lasalocida iz različnih tkiv perutnine poročajo tudi Kennedy in sodelavci (1995). Piščance brojlerje so štirinajst dni krmili s krmo, ki je vsebovala 90 mg lasalocida na kg krme. Razpolovna doba lasalocida v serumu je bila enajst ur, v jetrih šestintrideset ur in v mišičnem tkivu enainštirideset ur.

Ugotovljene vsebnosti lasalocida v jetrih so bile prvi dan 400  $\mu\text{g/kg}$ , peti dan 20  $\mu\text{g/kg}$  in sedmi dan 10  $\mu\text{g/kg}$ . Vsebnost lasalocida v mišičnem tkivu na začetku poskusa je bila 10  $\mu\text{g/kg}$  in je po petih do sedmih dneh padla na 0,5  $\mu\text{g/kg}$  (Kennedy in sod., 1995).

Pri piščancih, ki so s krmo sedem dni prejeli radioaktivno označen lasalocid v količini 125 mg/kg krme, so bile v tkivih ugotovljene naslednje vsebnosti: jetra 0,29 mg/kg, ledvica 0,13 mg/kg, koža z maščobo 0,34 mg/kg in mišično tkivo 0,05 mg/kg. Prvi dan karence ni bilo več ugotovljenih zaostankov v mišičnem tkivu, peti dan karence pa so vrednost padle na 0,04 mg/kg v jetrih, 0,03 mg/kg v ledvicah in 0,04 mg/kg v koži z maščobo (EFSA, 2004).

Pri puranih, ki so osem tednov dobivali medicirano krmo z dodanim lasalocidom v koncentraciji 125 in 200 mg/kg krme, so ostanke nespremenjenega lasalocida v jetrih, ledvicah, mišičnem tkivu, koži in maščobi ugotavljali po prvem, drugem in tretjem dnevu karence. Ugotovljene koncentracije lasalocida analiziranih tkiv pri dajanju krme s 125 mg/kg lasalocida so bile med 25  $\mu\text{g/kg}$  in 85  $\mu\text{g/kg}$ . Po tretjem dnevu karence ostanki lasalocida niso bili ugotovljeni v nobenem analiziranem tkivu.

Pri dajanju krme z 200 mg lasalocida/kg pa so bile vsebnosti v tkivih med 25  $\mu\text{g/kg}$  in 2250  $\mu\text{g/kg}$ . Po petih dneh karence je bila količina skupnega lasalocida v jetrih med 850 in 890  $\mu\text{g/kg}$ , v abdominalni maščobi 120  $\mu\text{g/kg}$ , ter med 70 in 110  $\mu\text{g/kg}$ , v ledvicah in v koži z maščobo (EFSA, 2007).

Z iztrebki živali se je izločilo približno 10 % nevezanega lasalocida (EFSA, 2007).

Metabolizem lasalocida so spremljali tudi pri štirinajst dni trajajoči študiji, opravljeni na puranih, ki so prejeli radioaktivno označen lasalocid v količini 127 mg/kg krme na dan. Ugotovljeno je bilo, da se je po petih dneh karence z iztrebki pri živalih moškega spola izločilo 83,4 % lasalocida in pri živalih ženskega spola 80,2 %. Opazili so povečano izločanje žolča, kar je povezano z absorpcijo in ponovnim kroženjem lasalocida v jetrih. Ob primerjanju metabolizma lasalocida pri piščancih in puranih je ugotovljeno, da ni bistvenih razlik med obema vrstama živali (EFSA, 2007).

## **2.7.2 Farmakokinetika lasalocida pri neciljnih živalskih vrstah**

### **2.7.2.1. Kokoši nesnice**

Kennedy in sodelavci (1996) opisujejo poskus, v katerem je trideset kokoši nesnic (pet skupin po šest živali v srednji dobi nesnosti, starih okoli 35 tednov) eksperimentalno prejelo krmo z dodatkom lasalocida v količinah, ki jih sicer lahko najdemo v primeru nenamerne navzkrižne kontaminacije v mešalnicah krmil, to je v koncentraciji 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg in 5,0 mg/kg (Kennedy in sod., 1996). Jajca so pobirali dvakrat dnevno, jih homogenizirali in pred analizo shranili pri temperaturi minus 20° C.

V jajcih je bil lasalocid ugotovljen že prvi dan po vnosu v organizem in je dosegel najvišje vrednosti po približno enem tednu (sedmih dneh). Pri najnižji koncentraciji (0,1 mg/kg krme) je bilo v jajcih ugotovljeno 6 do 8 µg/kg lasalocida, pri najvišji koncentraciji v krmi (5 mg/kg) pa je bilo v jajcih 300 µg/kg lasalocida.

Na podlagi rezultatov študije so ugotovili, da obstaja visoka stopnja soodvisnosti med koncentracijo lasalocida v krmi in ugotovljeno koncentracijo zaostankov lasalocida v jajcih. Avtor je na podlagi dobljenih rezultatov postavil izračun, ki se glasi:

»Koncentracija lasalocida v jajcih v µg/kg je enaka 63,6 - kratni koncentraciji lasalocida v krmi v mg/kg«.

Če to enačbo uporabimo za stopnje domnevnega prenosa, ki jih je pri svojem mnenju upoštevala EFSA, dobimo naslednje vrednosti zaostankov lasalocida v jajcih: pri 2 % navzkrižni kontaminaciji (2,5 mg/kg krme) znaša pričakovana vrednost v jajcih 160 µg/kg, pri 5 % navzkrižni kontaminaciji (6,25 mg/kg krme) znaša pričakovana vrednost v jajcih 400 µg/kg in



pri 10 % navzkrižni kontaminaciji (12,5 mg/kg krme) lahko v jajcih pričakujemo 800 µg lasalocida/kg ob upoštevanju koeficienta korelacije 0,999 (Kennedy in sod.,1996, EFSA, 2007).

V študiji, ki jo navaja EMA (EMEA/CVMP/46049/2006), je štiriindvajset kokoši nesnic s krmo dvanajst dni zapored prejelo radioaktivno označen lasalocid v koncentraciji 125 mg/krme. Medicirano krmo so živalim dajali trikrat dnevno (trije odmerki). Živali so bile razdeljene v dve skupini. V vsaki skupini je bilo dvanajst živali.

Znesena jajca so zbirali vseh dvanajst dni poskusa in še enaindvajset dni po končanem poskusu.

V prvi skupini so določali zaostanek lasalocida ločeno v beljaku in rumenjaku, v drugi skupini pa v celem jajcu. Rezultati poskusa so pokazali, da ima lasalocid visoko afiniteto do nalaganja v rumenjaku, kjer je bila tudi ugotovljena njegova najvišja vsebnost 32,5 mg/kg, medtem ko ga je bilo v beljaku 0,291 mg/kg.

Koncentracija zaostankov lasalocida v rumenjaku je naraščala v času uporabe antibiotika do sedmega dne, ob tem, da je bilo zelo težko doseči njegovo stabilno vsebnost koncentracije v preiskovanem matriksu. V beljaku je bila stabilna vsebnost koncentracije lasalocida dosežena že tri dni po začetku dajanja lasalocida.

Rezultati analize celega jajca so pokazali občutno nižje povprečne vsebnosti radioaktivno vezanega lasalocida. Povprečna koncentracija lasalocida v stabilni fazi je bila med 11 in 12 mg/kg. Po prenehanju krmljenja z lasalocidom so vsebnosti počasi padale v časovnem obdobju znotraj deset dni do 270 µg/kg, kar pomeni, da se lasalocid počasi in dolgo izloča z jajci (EMA, 2006).

Pri analizi celega jajca z metodo kromatografske separacije so bile najvišje vrednosti lasalocida A dosežene drugi dan (59,5 %), osmi dan (64,4 %) in deveti dan (65,8 %) po prenehanju uporabe lasalocida.

Lasalocid A je bil prisoten v količini med 27 % in 29 % glede na skupno radioaktivno količino, ostali metaboliti pa le med 2 % in 4 %. Molekularna struktura metabolitov lasalocida je bila analizirana z metodo LC-MS/MS. Rezultati so pokazali, da je bila prisotnost radioaktivnega metabolita v celem jajcu posledica oksidacije in /ali hidrosilacije molekule lasalocida A (EMA, 2006).

V študiji, ki so jo izvedli v Belgiji, so piščanci brojlerji eksperimentalno prejemali krmo z dodanim lasalocidom v koncentracijah 2,5 %, 5 % in 10 % od najvišje dovoljenega terapevtskega odmerka (Vandenberge in sod., 2012). V skupini je bilo 182 živali, ki so 14 dni prejemale krmo z dodanim lasalocidom in še 17 dni krmo brez dodanega zdravila. Živali so žrtvovali prvi, tretji, peti, sedmi, deveti, enajsti in trinajsti dan v času krmljenja z lasalocidom in prvi, tretji, peti, sedmi, deveti, enajsti, trinajsti, petnajsti in sedemnajsti dan, ko živali lasalocida niso več dobivale. Lasalocid so ugotavljali samo v prsni mišičnini piščancev. Rezultati so pokazali, da so bile pri vseh treh koncentracijah najvišje vsebnosti lasalocida ugotovljene peti dan po začetku krmljenja z lasalocidom. Vsebnosti so se zmanjšale pod mejo vrednotenja peti dan po prenehanju krmljenja za lasalocidom. Vsebnosti lasalocida so se izrazito znižale 19. dan poskusa, za kar avtorji nimajo jasne razlage (Vandenberge in sod., 2012).

V študiji so ugotavljali tudi vsebnost ostankov lasalocida v jajcih, jajčnem rumenjaku in beljaku. Jajca so zbirali od kokoši nesnic, ki so s krmo dobivale 2,5 % (3,1 mg/kg), 5 % (6,25 mg/kg) in 10 % (12,5 mg/kg) lasalocida. V poskusu, ki je trajal 14 dni, so kokoši nesnice 14 dni prejemale krmo z dodanim lasalocidom in še 17 dni krmo brez zdravila. Pri vsaki skupini so se cela jajca analizirala prvi, tretji, peti, sedmi, deveti, enajsti in trinajsti dan krmljenja z lasalocidom ter od prvega do sedemnajstega dne po prenehanju dajanja lasalocida. Ločeno so analizirali združene vzorce rumenjaka in beljaka.

V jajcih so bile najvišje vsebnosti lasalocida ugotovljene sedmi dan pri prejetanju krme z 2,5 % in 5 % lasalocida, ter deveti dan pri prejetanju krme z 10 % lasalocida. Pri koncentraciji 2,5 % so vsebnosti pod mejo vrednotenja zaznali trinajsti dan poskusa, pri koncentraciji 5% in 10 % pa sedemnajsti dan krmljenja brez lasalocida.

V rumenjaku so bile ugotovljene približno trikrat višje vsebnosti ostankov lasalocida kot v celem jajcu in več kot dvestokrat višje kot v analiziranem beljaku. Pri vseh treh skupinah so analizirane vrednosti lasalocida presegale vrednost MRL za jajca. Avtorji na podlagi izračuna predpostavljajo, da bi bile vrednosti lasalocida v jajcu ob upoštevanju 1 % nenamerne navzkrižne kontaminacije 95 µg/kg, kar je manj, kot je vrednost MRL za jajca. V študiji potrjujejo tudi predhodne ugotovitve raziskovalcev, da se lasalocid nalaga v jajčnem rumenjaku (Vandenberge in sod., 2012).

#### 2.7.2.2. Prepelice in fazani

Rezultati kinetičnih študij, ki so jih opravili pri prepelicah in fazanih, so pokazali, da so bile največje vsebnosti zaostankov lasalocida ugotovljene v koži, jetrih in maščobi.

Prepelice so s krmo sedemindvajset dni dobivale lasalocid v koncentraciji 90 mg/kg krme. Najvišje vsebnosti ostankov lasalocida so bile ugotovljene v koži z maščobo, in sicer prvi dan 298,3 µg/kg, tretji dan 55 µg/kg, šesti dan 30,8 µg/kg in deveti dan 33,7 µg/kg. Ugotovljene vsebnosti v koži z maščobo so bile desetkrat višje od vsebnosti v mišičnem tkivu živali (EMA, 2004).

Ob upoštevanju linearnega naraščanja se lahko pri uživanju krme, ki je bila izpostavljena nenamerni navzkrižni kontaminaciji pri domnevnih stopnjah 2 %, 5 % in 10 %, pričakujejo vsebnosti ostankov lasalocida v koži, ki znašajo 8 µg/kg, 21 µg/kg in 41 µg/kg.

Pri fazanih, ki so sedem dni dobivali krmo s koncentracijo lasalocida 132 mg/kg, so bile ugotovljene vsebnosti zaostankov lasalocida v jetrih 28,5 µg/kg in v koži z maščobo 30,7 µg/kg (EMA, 2004).

Podatki o opravljenih kinetičnih študijah za ostale neciljne živalske vrste niso znani.

#### 2.7.2.3. Ostale živali

Lasalocid se pri govedu in ovcah nalaga pretežno v jetrih. Pri govedu so ga ugotovili še drugi dan po prenehanju dajanja krme, ki je vsebovala 33 mg lasalocida na kg; vsebnosti v jetrih so bile med 25 µg/kg in 539 µg/kg. Vsebnosti lasalocida v ostalih tkivih (ledvica, maščoba, mišično tkivo) so bile nizke (60 µg/kg, 22 µg/kg, 10 µg/kg) (EC, 1990; Weiss, 1990; EFSA, 2007).

Tudi pri ovcah se lasalocid nalaga največ v jetrih; ugotovljene vsebnosti so podobne, kot pri govedu (EFSA, 2007).

Podatki o ostankih lasalocida v mleku so redki. V poskusu, kjer so krave prejemale lasalocid v koncentraciji 42 mg/kg krme, je bila povprečna ugotovljena vsebnost lasalocida v mleku 3,2 µg/kg (EFSA, 2007).

Po do sedaj zbranih podatkih ne obstajajo študije, ki bi obravnavale dinamiko metabolizma lasalocida pri prašičih in ribah.

Poskusi na laboratorijskih živalih (podgane in miši) so pokazali, da se največ lasalocida izloči iz organizma z urinom in fecesom znoraj štiriindvajsetih ur po prvi aplikaciji. Najvišje vrednosti v krvni plazmi pri podganah so bile izmerjene tri ure po aplikaciji (0,049 µg/ml), razpolovna doba je bila 4,8 ur (Hawkinsin sod., 1987).

## 2.8 OPREDELITEV TVEGANJA PRI UPORABI LASALOCIDA IN VZAJEMNO DELOVANJE ZDRAVIL

Kot za ostale ionoforne antibiotike tudi za lasalocid obstaja ozko področje varnosti med terapevtskim in toksičnim odmerkom. Za piščance je toksični odmerek približno trikratna dovoljena terapevtska koncentracija lasalocida v krmi. Purani so na lasalocid in vzajemno delovanje z ostalimi antibiotiki (tiamulin) manj občutljivi in zato pri dosledni uporabi zdravila v preventivne namene praviloma ne prihaja do zastrupitev (EFSA, 2004).

Opravljeni so bili poskusi vzajemnega delovanja lasalocida in monenzina s tiamulinom. Tiamulin deluje kot inhibitor citokromnega encima P450, zato bi lahko istočasna terapija z ionofornimi spojinami povzročila zaviranje metabolizma in s tem zmanjšano odstranjevanje le-teh iz organizma, kar se je dejansko pokazalo pri monenzinu (Szucs in sod., 2004).

Vendar pa so rezultati poskusa, ki so ga opravili na puranih (ciljna živalska vrsta), pokazali, da pri lasalocidu ni prišlo do škodljivega delovanja, kot se je to pokazalo pri monenzinu (Comben 1984; Ratz in sod., 1997). V poskusu so živali sočasno dobivale 250 mg tiamulina na liter vode, in sicer tri dni in ne pet, kot je predpisano v uradnih navodilih za uporabo tiamulina pri perutnini. Živali so prav tako dobivale krmo, ki je vsebovala 125 mg lasalocida/kg krme. V poskusu ni bilo ugotovljenih nobenih vplivov na proizvodne lastnosti živali.

Obstaja zelo malo podatkov o vzajemnem delovanju ionofornih in ostalih vrst antibiotikov, prav tako ni podatkov o morebitnih spremembah klinične slike in krvnih parametrov v okviru prej navedenih študij. Zato se v izogib škodljivega vzajemnega delovanja ne priporoča sočasnega predpisovanja lasalocida s tiamulinom ali drugimi inhibitorji citokromnega encima P450 (citokromne oksidaze) (Meingassner in sod., 1979, Weisman in sod., 1983a, 1983b, Lehel in sod., 1995, EFSA 2004).

### **2.8.1 Tveganje za zdravje pri neciljnih živalih, pri naključnem zaužitju krme za ciljne živali**

Psi in teleta so še posebej občutljivi na lasalocid, zato se lahko zaužitje krme, ki vsebuje koncentracije lasalocida, ki so le malo nad terapevtsko dozo pri perutnini, zanje konča tudi s smrtjo. Pri zastrupitvi prevladujejo znaki motenj v delovanju srca in živčevja.

Med najbolj občutljive neciljne živalske vrste spadajo kunci. Študija toksičnosti je pokazala, da je NOEL za maternalno in fetalno toksičnost odmerok lasalocida 0,5 mg/kg t.m. na dan.

Ob upoštevanju zaužitja 50 g krme na kg t.m., kar pri monogastričnih živalih predstavlja izhodišče za oceno tveganja, lahko predstavlja maksimalna terapevtska doza za perutnino (125 mg/kg krme) za kunce toksično količino, saj z njo zaužijejo 6,25 mg/kg t.m. lasalocida.

Konji, ki so bili po dosedanjih podatkih znani kot občutljiva živalska vrsta na ionoforne kokcidiostatike, so na lasalocid manj občutljivi.

Podatki, ki so na razpolago torej kažejo, da lahko naključno zaužitje krme, ki vsebuje najvišjo dovoljeno terapevtsko dozo lasalocida v krmi za perutnino, to je 125 mg/kg krme, vodi do zastruption pri neciljnih živalih (EMA, 2004; EFSA, 2007).

## **2.9 NAVZKRIŽNO ONESNAŽENJE KRME V PROIZVODNEM PROCESU**

Zaradi preprečevanja določenih bolezni v krmo pogosto dodajamo relativno visoke koncentracije farmakološko aktivnih substanc. Veterinarska zdravila so lahko v krmi prisotna kot dovoljeni krmni dodatki, kot nedovoljene substance, lahko pa so prisotna povsem naključno. Tako najdemo v zadnjem obdobju v literaturi podatke o navzkrižnem onesnaženju krme oziroma »prenosu« v proizvodnem procesu krme in krmnih mešanic. V enem obratu se lahko proizvajajo številne vrste krme, v isti proizvodni liniji pa se morda eden za drugim proizvajajo različni tipi proizvodov. Tako v proizvodni liniji ostanejo neizogibne sledi proizvoda, ki se vključijo v proizvodnjo drugega krmnega proizvoda. Ta prenos iz ene proizvodne serije v drugo se imenuje prenos ali navzkrižno onesnaženje (ang. carry – over).

Ocena tveganja za nastanek navzkrižne kontaminacije in njenih posledic je odvisna od velikosti mešalnic (industrijska ali individualna). V večini majhnih ali srednje velikih mešalnicah opravljajo dejavnosti z različnimi recepturami, ki jih zahteva trg, npr. krmo s specifično

vsebnostjo različnih dodatkov, kot so vitamini, elementi v sledovih, kokcidiostatiki, zdravila in drugo. Za pojav navzkrižne kontaminacije ni zanemarljivo tudi lastništvo mešalnic, upoštevanje načel dobre proizvodne prakse, izvajanje notranjega nadzora, dosledno uporabljanje tehnologij in receptur za pripravo krme (Strauch, 2003).

Tako se krma za neciljne živali, ki se proizvaja pri naslednjem postopku, onesnaži s tehnično neizogibnimi sledmi navedenih snovi. To neizogibno navzkrižno onesnaženje se lahko pojavlja v vseh stopnjah proizvodnje in predelave krme ter tudi med shranjevanjem in prevozom krme. Stopnja navzkrižne kontaminacije je seveda odvisna od tehnične opreme in proizvodnega procesa, kot tudi od fizikalno kemijskih značilnosti posameznega krmnega dodatka (Kennedy in sod., 1996, 1998; McEvoy in sod., 2003; Harner in sod., 1996).

Vsi ti dejavniki skupaj določajo količino zaostankov in stopnjo navzkrižne kontaminacije.

Podobno pa lahko izbrani premiks, ki se dodaja krmi, že sam po sebi vsebuje sledove drugih substanc kot posledico navzkrižne kontaminacije pri proizvodnji premiksa. Na stopnjo navzkrižne kontaminacije lahko vpliva tudi tehnična opremljenost mešalnic.

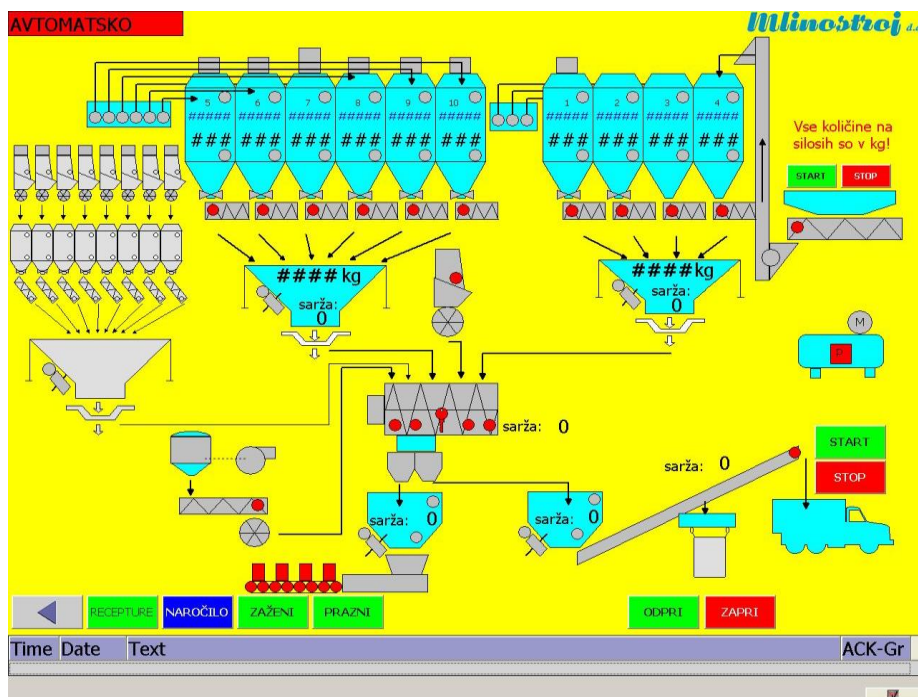
V krogu proizvodnje so ugotovljena naslednja mesta, kjer se zadržujejo ostanki krmil z možnimi posledicami, ki lahko povzročijo kontaminacijo naslednjih sarž krme:

- področja zmanjšane pretoka v cevovodih, police s surovinami, neravne površine (rebraste cisterne, tokovne sklopke, zvari), lahko privedejo do sedimentacije sestavnih delov krme;
- preveliki in dolgi prenosni sistemi, nepopolna ozemljitev delov proizvodnje;
- razlike v hitrosti pretoka materiala v silosih ali zabojnikih lahko povzročijo ločevanje posameznih frakcij, ki se potem nalagajo v mrtvih kotih in se strjujejo;
- konvejerji, ki se ne izpraznijo popolnoma kot npr. vijačni konvejerji ali višinska dvigala;
- uporaba različne opreme in konvejerskih sistemov lahko povzroči zmanjšan pretok na določenih področjih, v katerih se lahko nabira neželjeni material;
- filtrirni sistemi lahko kopičijo zaostanke materialov z visoko stopnjo prašnosti in hitrim pretokom skozi cevovode.

Na navzkrižno kontaminacijo vplivajo tudi fizikalno kemijske lastnosti samih krmnih dodatkov. Visoka stopnja prašnosti, nizka vlaga, lepljivost zaradi elektrostatičnega naboja, pogoji okolja (npr. zlepljanje zaradi prisotnosti vlage v zraku). Bolj kot so delci razpršeni in bolj drobni kot so, močnejše se odzivajo na naštetе faktorje; npr. delci manjši od 500  $\mu\text{m}$  se razpršujejo po zraku, kar omogoča njihovo raznašanje. Prašni delci se lahko tudi lažje nalagajo v proizvodnih poteh

in se v določenem trenutku sprostijo v večji količini, kar je prav tako pomembno. Prav tako povzroča navzkrižno kontaminacijo nalaganje sestavnih delov krme v filtrih in nezadostno ali neustrezno čiščenje.

K neželjeni kontaminaciji krme za neciljne živali lahko pripomorejo tudi dejavnosti znotraj in zunaj mešalnice kot npr. pomanjkljivo pranje ali celo opustitev pranja med posameznimi proizvodnimi serijami.



Slika 6: Računalniški nadzor v proizvodnem procesu krmil

(<https://adavtomatizacija.wordpress.com/reference/>, pridobljeno 27. 04. 2015)

Figure 6: Computer control in the manufacturing process of feed.

V študiji, ki je bila opravljena v Nemčiji in je vključevala 450 obratov za pripravo krme, je bilo ugotovljeno, da je bila pri več kot polovici analiziranih krmnih vzorcev ugotovljena 4 % stopnja navzkrižne kontaminacije (Strauch, 2002). Isti avtor je tudi ugotovil, da je priprava krmnih mešanic brez prenosa praktično nemogoča (Strauch, 2003).

O podobnih vrednostih stopnje navzkrižne kontaminacije poročajo tudi iz Belgije, kjer je bila le-ta ugotovljena pri proizvodnji krmnih briketov, medtem ko je bila pri analizi mlete krme pri 69 % analiziranih vzorcev ugotovljena 5 % navzkrižna kontaminacija (Ovocom, Efsa, 2004). Vse te raziskave se nanašajo na splošne/rutinske tehnične kontrole, ki se uporabljajo v mešalnicah krmil, niso pa bile izvedene primerjalne raziskave o obnašanju kokcidiostatikov med proizvodnim procesom. Kontrole krme so se opravile šele takrat, ko so bili ostanki kokcidiostatikov najdeni v naključno preiskovanih vzorcih živil.

Pri opravljenih sistematičnih raziskavah o obnašanju kokcidiostatikov v proizvodnem procesu krmnih mešanic (med njimi tudi lasalocida) je bilo ugotovljeno, da je navzkrižno kontaminacijo mogoče učinkovito zmanjšati z ustreznimi ukrepi. Kljub temu pa so bili kokcidiostatiki v krmi prisotni še po več »čistih« saržah proizvodnje (EFSA, 2007).

Noser in sodelavci (2006) poročajo o ugotovitvah, kjer so v proizvodnem procesu krme za piščance brojlerje ugotovili, da proizvodnja samo ene serije (sarže) krme, kjer se kokcidiostatiki niso dodajali, ni dovolj, da bi se količina lasalocida in narasina v krmi, ki se pripravlja za kokoši nesnice, zmanjšala na vrednost 30 µg/kg .

Kennedy in sodelavci (1996, 1998) so v svojih študijah, kjer so proučevali obnašanje lasalocida v proizvodnem procesu, ugotovili, da je prva serija proizvedene krme, ki ji lasalocid ni bil dodan, vsebovala približno 6 mg lasalocida na kg krme. Tudi deveta proizvodna serija je še vedno vsebovala lasalocid v krmi, in sicer v koncentraciji med 0,5 in 1 mg/kg krme.

Pri poskusu, kjer so lasalocid dodajali v obliki granulata, pa so bile vrednosti ugotovljene navzkrižne kontaminacije zmanjšane, vendar je bil lasalocid še vedno ugotovljen v četrti proizvodnji seriji po prenehanju dodajanja le-tega v krmo. Znano je, da so lahko ostanki lasalocida v proizvodnih poteh bistveno večji, če je zdravilo v obliki praška. (Kennedy in sod., 1998).

Neizogibno navzkrižno kontaminacijo v proizvodnem procesu so proučevali tudi Vandenberghe in sodelavci (2012). Ugotavljali so, da je proizvodnja brez tega praktično nemogoča, tveganje pa lahko zmanjšamo z upoštevanjem načel sistema HACCAP (analiza tveganja in ugotavljanja kritičnih kontrolnih točk) ter dobre proizvodne prakse v vseh fazah proizvodnje. Priporočajo vzorčenje krme po zaključku proizvodnega procesa z dodanimi kokcidiostatiki in opozarjajo na nizke vsebnosti in neenakomerno porazdelitev aktivnih substanc v vzorcih krme. Prav tako priporočajo več študij s področja pojavljanja in pomena navzkrižne kontaminacije, ocene tveganja za neciljne živali, spremljanje porazdelitve in nalaganja zdravilnih substanc v različnih tkivih, še posebej v jajcih, ugotavljanje vsebnosti kokcidiostatikov pa naj bi temeljijo na fizikalno kemijskih lastnostih aktivne sestavine.

V študiji, ki so jo opravili na Nizozemskem in bo služila kot pomoč pristojnemu ministrstvu ter Agenciji za varnost hrane in zaščito potrošnikov, so proučevali veljavno zakonodajo, predvsem s stališča vzorčenja za nadzor navzkrižne kontaminacije krme (M. van der Spiegel, P. Sterenburg in H. J. van Ergmond, 2013). Ugotovili so, da je najbolj kritična prva sarža nove vrste krme po koncu proizvodnje krme, ki ji je bil dodan kokcidiostatik, ker se takrat zdravilo



še ne odstrani v celoti iz proizvodnih poti. Druga kritična točka so transportne poti, ki se vračajo direktno v silos, kjer je peletirana krma, ter področja, kjer je krma v razsutem stanju. Navzkrižno kontaminacijo lahko zmanjšamo z izboljšanjem proizvodnih naprav (čim bolj enostavne – pretočne proizvodne poti, brez nepotrebnih zavojev ali ovir). Glede vzorčenja pa priporočajo, da se vzorci krme jemljejo čim bližje končni destinaciji proizvodnega procesa (npr. pri nakladanju), kajti le tako pridobimo reprezentativne vzorce krme, ki jo bodo zaužile tudi živali. Prav tako lahko tveganje zmanjšamo z ustreznimi tehničnimi in organizacijskimi ukrepi. Kljub upoštevanju pravil dobre proizvodne prakse pri pripravi krmnih mešanic, je nesporna ugotovitev, da se je v praksi nemogoče izogniti nenamerni navzkrižni kontaminaciji krme s kokcidiostatiki. Zato je Evropska Komisija leta 2009 sprejela Direktivo 2009/8, s katero je spremenila Prilogo 1 Direktive 2002/32, ki ureja vsebnosti neželenih snovi v krmi in v njo je vključila tudi najvišje vsebnosti kokcidiostatikov, ki pridejo v krmo zaradi nenamerne onesnaženja. Direktiva določa, da so še sprejemljive vsebnosti, ki jih lahko najdemo v krmi za neciljne živali tiste vrednosti, ki pomenijo 1 % od predpisanih vrednosti (preglednica 5).

**Preglednica 5:** Mejne vrednosti lasalocida v krmi za neciljne živali zaradi neizogibnega prenosa, določene z Direktivo 2009/8.

**Table 5:** Maximum levels of unavoidable carry-over of lasalocid in for non-target feed laid down by Directive 2009/8/EC.

Nezaželena snov	Proizvodi, namenjeni za prehrano živali (1)	Največja vsebnost v mg/kg pri krmi z 12-odstotno vsebnostjo vlage
Lasalocid natrij	Posamična krmila	1,25
	Krmna mešanica za:	
	- pse, teleta, kunce, konje, molznice, nesnice, purane (> 12 tednov) in piščance za nesnice (> 16 tednov),	1,25
	- pitovne piščance, piščance za nesnice (< 16 tednov) in purane (< 12 tednov) v obdobju pred zakolom, ko je uporaba lasalocid natrija prepovedana (krma v karenci),	1,25
	- druge živalske vrste.	3,75
	Premiksi, ki se uporabljajo v krmi, pri kateri uporaba lasalocid natrija ni dovoljena.	(2)

(1) Brez poseganja v dovoljene vrednosti iz Uredbe (ES) št. 1831/2003 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 22. Septembra 2003 o dodatkih za uporabo v prehrani živali.

(2) Mejna vrednost snovi v premiksu je koncentracija, ki ne presega 50 % mejne vrednosti snovi v krmi, ki se ugotovi ob upoštevanju navodil za uporabo premiksa.

Vrednosti so bile določene na podlagi mnenj EFSE za vsak kokcidiostatik, ki je registriran kot dovoljen krmni dodatek, z upoštevanjem 2 %, 5 % in 10 % domnevne stopnje prenosa iz krme z najvišjimi dovoljenimi vrednostmi posameznega kokcidiostatika. Te vrednosti naj ne bi povzročale prekomernih zaostankov posameznih kokcidiostatikov v živilih živalskega izvora in s tem predstavljale tveganje za zdravje ljudi (Direktiva Komisije 2009/8).

### **2.9.1 Ostanki lasalocida v krmi za neciljne živali**

V literaturi najdemo zelo malo podatkov o navzkrižni kontaminaciji krme namenjene drugi živalski vrsti. Podatki iz Češke iz leta 2006 govorijo, da so med 254 preiskanimi vzorci ugotovili samo en pozitiven vzorec. To je bila popolna krmna mešanica za prašiče pitance, ki je vsebovala 8,41 mg lasalocida/kg. Na Danskem je bilo v letih med 2004 in 2007 analiziranih 111 vzorcev krme. Vsi vzorci so bili odvzeti po prvi proizvodni seriji krme v mešalnicah krmil, ki se je pripravljala za neciljne skupine, in sicer takoj po končanem proizvodnem procesu priprave krmnih mešanic za perutnino in po opravljenem čiščenju. Rezultati analiz so pokazali en pozitiven vzorec krme. Krma je vsebovala 0,26 mg lasalocida/kg (EFSA, 2007).

Po podatkih RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) je bilo v obdobju od aprila 2002 do aprila 2006 prijavljenih devet primerov, ko je krma vsebovala lasalocid, čeprav ga ne bi smela. Ugotovljene koncentracije so bile med 0,003 in 12,07 mg lasalocida/kg krme, v enem vzorcu pa je bilo ugotovljenih celo 64,6 mg lasalocida/kg (EFSA, 2007).

V primerjavi s podatki iz drugih držav imamo v Sloveniji o vsebnosti lasalocida v krmi precej podatkov. V obdobju od 1994 do 1996 je bilo na lasalocid natrij skupno preiskanih 174 vzorcev krme, od katerih je bilo kar 151 (86,8%) neustreznih. Rezultati so posledica dejstva, da se je v tem obdobju lasalocid natrij uporabljal v obliki praška in se kot takšen bolj nalagal v proizvodnih poteh mešalnic krmil. V obdobju od 2001 do 2007 je bilo skupno preiskanih 198 vzorcev. Zaradi lasalocida je bilo neustreznih 15 (7,6 %) vzorcev (Kalcher, 2008). V letih 2013 in 2014 lasalocid v krmi za kokoši nesnice ni bil ugotovljen (MKGP, 2015).

## 2.10 OSTANKI LASALOCIDA V ŽIVILIH ŽIVALSKEGA IZVORA NECILJNIH ŽIVALI

Ostanki lasalocida v živilih živalskega izvora (tkivih) in jajcih so lahko posledica bodisi navzkrižne kontaminacije, ali pa so neciljne živalske vrste dobivale krmo, ki je bila prvotno namenjena ciljnim živalskim vrstam, bodisi naključno ali celo namerno.

Na podlagi zahtev Direktive Sveta, št. 96/23 se morajo v vseh DČ opravljati analize na ostanke neželenih snovi v jajcih, jetrih in mišičnem tkivu pri različnih živalskih vrstah, ki vstopajo v prehranjevalno verigo ljudi (Direktiva Sveta (ECC), št. 96/23). Primerjava združenih rezultatov preiskanih vzorcev za leto 2004 in 2005 kaže na različno interpretacijo ustreznih in neustreznih vzorcev, ker zakonodaja na tem področju takrat še ni bila poenotena. Prav tako so ugotovili, da termin definicije neustreznega vzorca ni usklajen znotraj DČ, vendar je večina držav uporabila koncentracijo 10 µg lasalocida na kg tkiva kot tisto vrednost, pri kateri so se preiskani vzorci šteli kot neustrezni. Rezultati kažejo, da je bilo od skupno 13490 analiziranih vzorcev neustreznih 185 vzorcev. Podrobnejši prikaz vrste in števila vzorcev je v preglednici 6.

**Preglednica 6:** Združeni rezultati opravljenih analiz na ostanke lasalocida različnih tkiv v državah članicah v letih 2004-2005 (EFSA, 2007).

**Table 6:** Combined result of analyses residues in Member States in 2004 and 2005 (EFSA, 2007).

Vrsta tkiva	Število analiz	Neustrezni vzorci
Jajca	3248	130
Perutnina	4098	43
Gojena divjad	289	9
Prašiči	2350	2
Ovce/koze	1084	1
Govedo	2058	0
Kunci	301	0
Konji	67	0

Glede na dejstvo, da so se rezultati v DČ zelo razlikovali tudi glede na uporabljene analitične metode, mejo zaznavnosti in opredelitve glede ustreznih in neustreznih vzorcev, je primerno,

da podrobneje predstavimo študijo, ki so jo opravili v Veliki Britaniji, v kateri so upoštevali tudi analizo tveganja.

V Veliki Britaniji so v okviru monitoringa na ostanke kokcidiostatikov v letih 1995–2005 analizirali številna živila živalskega izvora. Visoke koncentracije lasalocida so bile ugotovljene pri kokošnjih in prepeličjih jajcih, v slednjih je bil lasalocid pogosto ugotovljen.

Rezultati enajstletne študije kažejo, da je 4,8 % vzorcev kokošnjih jajc vsebovalo merljivo vsebnost lasalocida, in sicer od 2 do 3450 µg/kg, pri tem da so pri tej visoki vsebnosti sklepali, da gre za zaužitje krme, ki ni bila namenjena za kokoši nesnice. Visoke ugotovljene vsebnosti lasalocida, (640 µg/kg) v posameznih vzorcih piščančjih jeter, raziskovalci razlagajo kot neupoštevanje predpisane terapevtske doze ali neupoštevanje karence, redkeje pa kot vzrok navajajo možnost navzkrižne kontaminacije krme v proizvodnem procesu.

Zanimiv je tudi podatek, da so bile zelo visoke vsebnosti lasalocida ugotovljene v prepeličjih jajcih, celo do 5400 µg/kg. Predpostavljajo, da je bila visoka koncentracija ostankov lasalocida posledica uporabe nedovoljene krme za prepelice nesnice, kar potrjuje tudi visoka ugotovljena vsebnost lasalocida v mišičnem tkivu prepelic (400 µg/kg).

V poskusu, ki so ga opravili pri prepelicah, so bile najvišje vsebnosti lasalocida ugotovljene v koži (brez upoštevanja karenčne dobe). Ob upoštevanju 10 % stopnje navzkrižne kontaminacije, bi bila pričakovana koncentracija v koži 41 µg/kg.

Študija ugotavlja, da pozitivni vzorci vsebujejo relativno visoke vsebnosti lasalocida v piščančjih in prepeličjih jajcih, prav tako so bile visoke vsebnosti ugotovljene tudi v mišičnem tkivu prepelic ter v piščančjih in puranjih jetrih.

Pri preiskanih 468 vzorcih jeter telet, prašičev in drobnice ostanki lasalocida niso bili ugotovljeni, prav tako ni podatkov o morebitnih ostankih lasalocida v mleku (EFSA, 2007).

Podrobnejši rezultati so predstavljeni v preglednici 7.

**Preglednica 7:** Rezultati ostankov lasalociada v živilih v Veliki Britaniji (UK-VMD, 1995-2005).

**Table 7:** Results of the UK surveys of foods for lasalocid (UK-VMD, 1995-2005).

Vrsta tkiva	Število vzorcev	Število pozitivnih vzorcev	Najvišja ugotovljena konc. ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Kokošja jajca	2855	138 (4,8 %)	3450
Otroška hrana na jajčni osnovi	397	0	-
Mišično tkivo piščancev	759	1 (0,13 %)	83
Ocvrti piščanci	10	0	-
Otroška hrana na osnovi pišč. mesa	101	0	-
Piščančja jetra	411	19 (4,6 %)	640
Brojlerji-jetra	1775	7 (0,39 %)	415
Jetra kokoši	108	0	-
Mišično tkivo puranov	72	0	-
Proizvodi iz puranjega mesa	20	0	-
Jetra puranov	341	1 (0,29 %)	120
Prepeličja jajca	70	31 (44 %)	5400
Mišično tkivo prepelic	50	11 (22 %)	400
Račja jetra	45	0	-
Piščančji burgerji	44	0	-
Mišično tkivo kuncev	112	0	-
Divjačina	22	0	-
Jetra teleti	52	0	-
Jetra ovac	316	0	-
Jetra prašičev	100	0	-
Klobase iz svinjine	100	0	-
Gosi	140	0	-

Na podlagi teh podatkov in podatkov obstoječih kinetičnih študij lasalocida lahko zaključimo, da se največ ostankov lasalocida zadržuje v jajcih in jetrih, medtem ko so vrednosti v ostalih tkivih (koža z maščobo, ledvice in mišično tkivo) bistveno nižje.

Podatki, da se lasalocid nalaga v jajcih in to predvsem v rumenjaku, so bili bistveni za razširitev vrednosti MRL tudi na jajca (EMA, 2006).

Z upoštevanjem Kennedyjeve študije in uporabi njegovega izračuna (Kennedy in sod., 1996), ki ugotavlja tesno povezavo med koncentracijo lasalocida v krmi in ostankov lasalocida v jajcih, so strokovnjaki Znanstvenega odbora za prehrano živali pri Evropski agenciji za varnost hrane ocenili, da bi bile ob nenamerni neizogibni navzkrižni kontaminaciji krme z lasalocidom ob upoštevanju domnevne stopnje 2 %, 5 % in 10 % pričakovane vrednosti ostankov lasalocida v jajcih 160 µg/kg, 400 µg/kg in 800 µg/kg (EMA, 2006; EFSA, 2007).

Vse te vrednosti presegajo določeno vrednost MRL za jajca, ki je 150 µg/kg (Uredba Komisije (EU) št. 37/2010).

Ocenjene vrednosti nalaganja ostankov lasalocida v jetrih goveda in drobnice se ob upoštevanju 10 % nenamerne navzkrižne kontaminacije (živali prejmejo s krmo 12,5 mg lasalocida /kg t.m.) gibljejo pri govedu 2500 µg/kg in pri drobnici 1400 µg/kg. Pri stopnji 2 % navzkrižne kontaminacije (2,5 mg/kg krme) pa so ocenjene vrednosti ostankov lasalocida v jetrih govedi 500 µg/kg.

Pri analizi 468 vzorcev jeter na ostanke lasalocida v letu 2005 v Veliki Britaniji v vzorcih jeter telet, prašičev in drobnice ni bilo ugotovljenih zaostankov preiskovanega antibiotika (UK-VMD, 1995–2005).

Iz Belgije poročajo o rezultatih 958 pregledanih vzorcev, ki so bili zbrani v letih 2005 in 2006. Vzorci mišičnega tkiva in jajc so izvirali od različnih vrst živali. Rezultati analize kažejo, da so v petih vzorcih jajc ugotovili koncentracijo 26, 27, in 61 µg/kg lasalocida (dva–krat o koncentraciji ni bilo podatka). Omenjene vrednosti so presegale vrednost 10 µg/kg, kar se je vrednotilo kot neustrezno. Devet vzorcev se je nahajalo med mejo detekcije 2 µg/kg in vrednostjo 10 µg/kg.

V študiji, ki je zajemala osem različnih evropskih držav, je bilo na vsebnost ostankov devetih različnih kokcidiostatikov, med katerimi je bil tudi lasalocid, analiziranih 320 vzorcev jajc. Vzorci jajc so bili razdeljeni glede na poreklo in način reje (prosta reja, ekološka reja, kletke in

vzorci brez oznake načina reje). Pozitivnih je bilo 137 vzorcev. Največkrat so bili ugotovljeni salinomycin (43,8 %), diklazuril (19,0 %) in lasalocid (17 %), monensin in narasin pa v 2 %. Lasalocid je bil najpogosteje ugotovljen v vzorcih jajc, ki so izvirali iz Francije, prav tako so bile tu ugotovljene tudi njegove najvišje vsebnosti od 27 do 49 µg/kg (Mortier in sod., 2005 b).

Študija iz Švice, kjer je bilo v letih 2004 in 2005 na kokcidiostatike (lasalocid, monenzin, narazin, nicarbazin in salinomycin) analiziranih 115 kokošjih jajc, je pokazala, da so bili ostanki zdravil ugotovljeni pri 29 % vzorcev v letu 2004 in 14 % v letu 2005. Najvišje ugotovljene vrednosti so bile za nicarbazin 19,7 µg/kg in 18,0 µg/kg za lasalocid. Pri analiziranih 48 vzorcih perutninskega mesa je bilo pozitivnih 8 vzorcev (15 %), med njimi sta dva vzorca vsebovala 30,5 in 4,1 µg/kg lasalocida (Noser in sod., 2006).

Podatki monitoringa na ostanke veterinarskih zdravil in kokcidiostatikov v vzorcih jajc na Poljskem v letih 2007 do 2012 in primerjava z rezultati EU kažejo, da v letih 2007 in 2010 lasalocid ni bil ugotovljen v nobenem vzorcu (v EU 7 pozitivnih vzorcev v letu 2007 in 2 vzorca v letu 2010). V letu 2008 sta bila ugotovljena dva pozitivna vzorca (v EU 10 vzorcev), v letu 2009 pa en pozitiven vzorec jajc (v EU 13 pozitivnih vzorcev). Zmanjšanje števila neskladnih vzorcev pri ugotavljanju kokcidiostatikov pripisujejo izboljšani kakovosti krme in sprejetim mejnim vrednostim, ki veljajo tudi za krmo za neciljne živali (M. Piatkowska, P. Jezdiniak, J. Żmudzki, 2012).

Iz dokumentov o oceni tveganja na zdravje ljudi, ki jih je pripravil Inštitut za oceno tveganja in zdravje ljudi iz Nemčije, na podlagi monitoringa ostanke kokcidiostatikov v letih 2008 do 2011, razberemo tudi število pozitivnih vzorcev na ostanke lasalocida. Tako je bilo v letu 2008 preiskanih 206 vzorcev jeter govejih pitancev. Lasalocid je bil ugotovljen v treh vzorcih v vrednostih od 0,7 do 3,89 µg/kg. Od skupno preiskanih 337 vzorcev jeter prašičev je bil lasalocid ugotovljen pri štirih vzorcih (1,2 %), v vrednosti od 3,14 do 29,7 µg/kg. Pri vzorcih mesa piščancev pa je bil lasalocid ugotovljen v dveh vzorcih v vsebnosti 34 in 36 µg/kg.

V devetih vzorcih jajc so bile vrednosti ugotovljenega lasalocida med 0,45 in 21,3 µg/kg (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2008).

V letu 2009 je bilo na ostanke lasalocida preiskanih 308 vzorcev jajc, od tega je 10 vzorcev (3,2 %) vsebovalo lasalocid v vrednostih od 0,42 do 100,4 µg/kg. V letu 2010 je bila vsebnost

lasalocida nad MRL ugotovljena v enem vzorcu jajc (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2009 in 2011).

V letu 2011 je bil od skupno preiskanih 223 vzorcev jajc en vzorec pozitiven, vsebnost lasalocida je bila 587 µg/kg, kar je verjetno posledica uporabe krme, ki ni bila namenjena za kokoši nesnice (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2012).

V Sloveniji je bil prav tako opravljen monitoring na prisotnost kokcidiostatikov v različnih živalskih tkivih in v jajcih. V obdobju 1994 do 2007 je bilo na ostanke lasalocida preiskanih 1360 vzorcev mesa in jeter perutnine, goved, prašičev, kuncev, konj in ovc ter 513 konzumnih jajc. Različni kokcidiostatiki so bili ugotovljeni v 84 vzorcih, od tega je bil lasalocid ugotovljen v kar 75 vzorcih. V vzorcih preiskanih jajc je bil lasalocid ugotovljen v 10,7 % (55 vzorcih), MRL je bil presežen pri 3,8 % preiskanih jajc. V jetrih in mesu perutnine je bil lasalocid ugotovljen pri 6,2 % preiskanih vzorcih, MRL je bil presežen v sedmih vzorcih jeter in enem vzorcu mesa. Lasalocid je bil prav tako ugotovljen v štirih (0,8 %) vzorcih mesa in jeter drugih živalskih vrst (govedo, prašiči, kunci) (Šinigoj in sod., 2010).

V letih 2008 je bilo v okviru monitoringa na ostanke kokcidiostatikov preiskanih 202 vzorca jajc in 207 vzorcev jajc v letu 2009. V letu 2009 je bilo ugotovljenih 9 neskladnih vzorcev, vendar ni bil ugotovljen lasalocid, v letu 2008 pa neskladja niso bila ugotovljena (Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, 2008; 2009).

V letu 2010 je bilo odvzetih 166 vzorcev jajc, neskladnost je bila ugotovljena pri štirih vzorcih, pri treh je bil ugotovljen maduramicin in pri enem lasalocid z vsebnostjo > 250 µg/kg (Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, 2010). V letu 2012 je bilo v okviru monitoringa v živilih živalskega izvora analiziranih 216 vzorcev jajc, neskladnosti glede kokcidiostatikov niso bile ugotovljene. V letu 2013 je bilo preiskanih 192 vzorcev jajc. Neskladnost je bila ugotovljena pri dveh vzorcih, v obeh primerih je bil ugotovljen narasin (Ministrstvo za kmetijstvo in okolje, 2012; 2013).

## 2.11 TVEGANJE ZA ZDRAVJE LJUDI

Znanstveniki Odbora za onesnaževala v prehranski verigi pri Efsi (CONTAM) so skladno s členom 29 (1) Uredbe (ES) 178/2002, ugotavljali tveganje za zdravje ljudi pri uživanju živil, ki izvirajo od neciljnih živali (Uredba (ES) 178/2002). ADI za lasalocid je 5 µg/kg t.m. na dan,



kar je 300 µg za 60 kg potrošnika. Določen je bil na podlagi NOEL vrednosti 0,5 mg/kg t. m (ob upoštevanju faktorja negotovosti 100), ki je rezultat dvoletne študije kronične oralne toksičnosti pri podganah in študije maternalne toksičnosti pri kuncih.

Pri analizi tveganja je bila upoštevana priporočena dnevna količina zaužitih živil na podlagi Direktive (ES) 79/2001, ki vključuje 100 g jajc in 100 g jeter (Direktiva (ES) 79/2001). Predpostavljajo, da bi uživanje takšne količine živil, ki izvirajo od neciljnih živali, ki so s krmo dobivale lasalocid, zaradi 2, 5 in 10 % nenamerne navzkrižne kontaminacije, lahko povzročilo tveganje za zdravje ljudi. Pričakovane vsebnosti ostankov lasalocida v jetrih in jajcih znašajo med 0,27 µg/kg, 0,66 µg/kg in 1,3 µg/kg t.m., kar pomeni med 5 %, 13 % in 27 % vrednosti dnevno sprejemljivega vnosa za lasalocid.

Če to opišemo na primeru potrošnika, ki tehta 60 kg in zaužije 100 g jeter, ki izvirajo od živali, ki je prejela krmo, ki je bila onesnažena s stopnjo 10 % kot posledico nenamerne navzkrižne kontaminacije, dobi ta oseba ob zaužitju govejih jeter 4,2 µg/kg t.m. (252 µg na osebo) in ob zaužitju ovčjih jeter 2,3 µg/kg t.m. (138 µg) lasalocida na dan.

V najslabšem primeru, da potrošnik na isti dan zaužije tako jajca kot jetra govedi, ki izvirajo od živali, ki je prejela krmo, ki je bila onesnažena z 10 % stopnjo nenamerne kontaminacije, so rezultati lahko že zaskrbljujoči in je izpostavljenost tveganju bistveno večja. Ko seštejemo oba taka pričakovana dnevna vnosa s hrano, je to 4,2 µg/kg t.m. za jetra in 1,3 µg/kg t.m. za jajca. Dobimo vrednost 5,5 µg/kg t.m., ki rahlo presega ADI za lasalocid (5 µg/kg).

Na podlagi upoštevanja pričakovanih količin ostankov lasalocida v jetrih in koži piščancev, ki so krmljeni z medicirano krmo, znašajo pričakovane vsebnosti v teh tkivih 0,13 µg/kg t.m. in ta vrednost predstavlja približno 3 % ADI, kar je zanemarljivo.

Na podlagi teh ugotovitev so strokovnjaki Odbora CONTAM zaključili, da je možnost zaužitja živila, ki izvira od živali, ki so prejemale krmo, ki je bila onesnažena z 10 % stopnjo nenamerne navzkrižne kontaminacije, v naravi majhna oziroma zelo redka.

Zaključili so, da predstavlja uživanje teh živil nizko stopnjo tveganja za zdravje ljudi, kljub temu pa tveganje ni zanemarljivo (EFSA, 2007; EMA, 2015).

ADI vrednost za neurotoksično delovanje lasalocida je 2,5 µg/kg (0,0025 mg/kg) t.m. na dan (ob upoštevanju 200 kratnega faktorja negotovosti). Vrednost mikrobiološkega še sprejemljivega dnevnega vnosa pa je 4,91 µg/kg (0,00491 mg/kg) t. m. (EMA, 2004; 2006).

Po podatkih iz literature lahko kokcidostatiki pri ljudeh vplivajo na delovanje srca. Zaradi vezave  $\text{Ca}^{2+}$  ionov na molekulo lasalocida in njihovo prenašanje skozi celično membrano in njihovo sproščanje v celici, lahko privede do večje propustnosti membrane in odmiranja celic. Nepoškodovana celica namreč nenehno vzdržuje ionsko ravnovesje, lasalocid s svojimi vezanimi kationi pa to ravnovesje poruši. Celice zaradi tega porabijo več energije, da to ravnovesje vzdržujejo, kar vodi do njihovega odmiranja (Young in Nunan, 2004; Rokka in sod., 2013).

Poskus, ki so ga opravili na celicah srčne mišice bolnika, pri katerem je bila diagnosticirana atrijska fibrilacija, je pokazal veliko aktivnost kalcijevih kanalov. Znanstveno ni dokazano, da bi lahko ostanki lasalocida v živilih živalskega izvora povzročili pri ljudeh fibrilacijo atrijev. Kljub temu pa tveganje pri uživanju jajc, zlasti za srčne bolnike ni zanemarljivo, zato se priporoča previdnost (Young in Nunan, 2004; Gee, 2005 in Rong in sod., 2013).

Poskusi na srčni mišici kuncev, podgan, psov in človeka so potrdili, da lasalocid poveča moč kontrakcij srčne mišice. Učinek traja še eno uro po dodatku zelo majhne količine lasalocida v raztopino, kjer so se nahajala eksperimentalna tkiva (Young in Nunan, 2004).

Kljub temu da se kokcidostatiki ne uporabljajo v humani medicini, se pojavljajo možnosti za njihovo uporabo v prihodnosti. Zanimanje je zaznati zlasti na področju onkologije, zaradi njihovega znanega zaviralnega učinka na ATP prenašalce (ang. ATP- Binding Cassette efflux transporters). Slednji prenašajo večkratno odpornost zdravila/multirezistenco na citostatike, ki jih uporabljajo za zdravljenje rakastih obolenj (Dorne in sod., 2013).

Uživanje priporočene dnevne količine jajc (100 g ali približno dve jajci povprečne teže 60 g) ne predstavlja tveganje za zdravje ljudi (Domingo, 2013), problematično pa je lahko uživanje večje količine jajc ali samih rumenjakov pri raznih dietah, usmerjeni prehrani športnikov ter srčnih bolnikov (Gee, 2005; Kart in Bilgili, 2008 in Goetting in sod., 2011).

## 2.12 VPLIVI NA OKOLJE

Lasalocid in njegovi produkti pridejo v okolje z izločki bodisi zdravljenih živali ali pa tistih, ki so zdravilno učinkovino prejemale kot krmni dodatek, ki se največkrat uporabljajo za gnojenje kmetijskih površin. Pri tem prihaja do stika med zdravilno učinkovino in organizmi v okolju, zemljo in vodo, zato jih lahko uporabljamo tudi kot sledila in indikatorje izvora kmetijskega onesnaženja. Na koncentracijo spojin v okolju vplivajo poleg vrste tal tudi izvorne koncentracije posameznega kokcidostatika. Zato sklepajo, da bi se lasalocid lahko pojavil v visokih koncentracijah. Razgradnja je odvisna od kemijskih lastnosti kokcidostatika in lastnosti okolja, v katerem se nahaja (temperatura, vlaga, pH-vrednost, vsebnost organskih spojin).

Ob upoštevanju dovoljenih koncentracij lasalocida v krmi lahko pričakujemo potencialne koncentracije v tleh 0,58 mg/kg, v površinski vodi 9,6 µg/l in v podzemni vodi 29 µg/l (Koroša in sod., 2014).

Celotna poraba kokcidostatikov v Sloveniji je okoli 45 ton letno, od tega jih je 90 % ionoforov. V letih od 2010 do 2014 so bile na leto povprečno prodane približno tri tone proizvoda Avatec 150 G, ki vsebuje aktivno komponento lasalocid natrij (leta 2010 pet ton, 2011 dve toni, 2012 štiri tone, 2013 dve toni in 2014 tri tone). Navedene količine se nanašajo izključno na prodajo v Sloveniji in v njih niso zajete količine, ki jih posamezni proizvajalci (npr. Perutnina Ptuj) kupijo v tujini, skupaj s krmno mešanico (podatki pridobljeni po e-pošti, firma Agrovit d. o. o., 2015).

## 2.13 UGOTAVLJANJE LASALOCIDA V IZTREBKIH

Felling opisuje študijo metabolizma in izločanja lasalocida, ki je bila opravljena pri piščancih brojlerjih baterijske reje. Piščanci so prejemali krmo z dodatkom lasalocida v koncentraciji 75 mg/kg v času od nič do enajst tednov. Vzorce iztrebkov so zbirali trikrat tedensko, in sicer v tednih od nič do štiri, po dva odvzema tedensko v tednih pet, šest in deset in en odvzem vzorca v tednih sedem, devet in enajst. Iz vseh odvzetih odbirkov so bili pripravljene in analizirani po trije skupni vzorci iz vsakega tedna.

Vzorci so bili analizirani s postopkom tankoplastne bioavtografije. Rezultati so pokazali padanje koncentracije lasalocida v iztrebkih glede na naraščanje starosti piščancev s povprečno

začetno vrednostjo od 5 do 6 mg/kg in od 2,2 do 3,0 mg/kg na koncu poskusa (Felling, 1975; EFSA 2004).

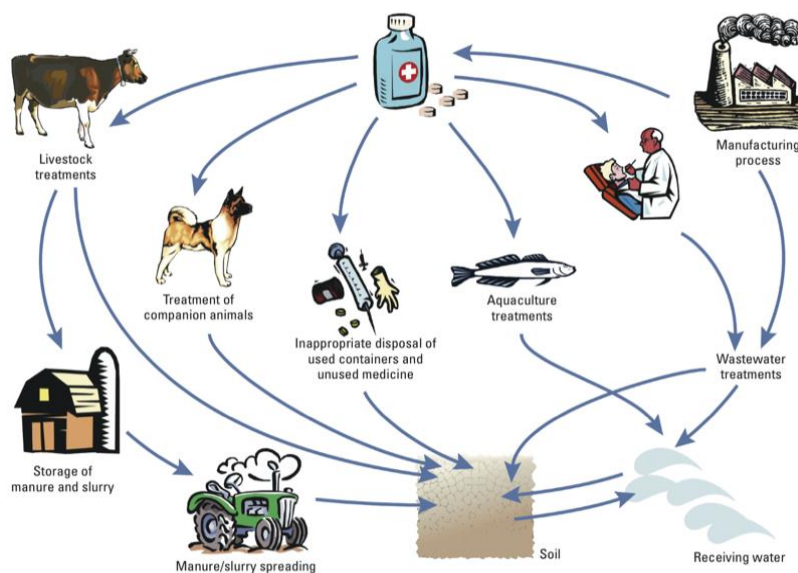
V poskusu, ki ga opisuje Hane (EFSA, 2004), je bila opravljena analiza koncentracije lasalocida v nastilju pri dveh skupinah piščancev talne reje. Nastil se je zbiral v dveh do treh zaporednih vzrejnih ciklikih, vsak cikel je trajal enajst tednov. Brojlerji so prejeli krmo s vsebnostjo lasalocida 75 mg/kg. Upoštevana je bila karenčna doba pet dni in enotedenski razmik med skupinami. Vzorčenje je bilo opravljeno z navzkrižnim povprečjem nastilja. Rezultati so pokazali, da ni bilo opaženih razlik v koncentraciji lasalocida glede na globino nastilja. Povprečna ugotovljena koncentracija lasalocida je bila med 2 in 6 mg/kg, kar pomeni, da je prisotnost lasalocida stabilna in enakomerna.

Primerljiva študija izločanja lasalocida z iztrebki je bila opravljena z ugotavljanjem lasalocid natrija označenega s C<sup>14</sup>. Piščanci so s krmo sedem dni prejeli lasalocid v koncentraciji 125 mg/kg. Analiza iztrebkov je pokazala, da se je v največji meri izločil lasalocid A, in sicer med 74 do 83 % od skupno radioaktivno vezanega ostanka. Ugotovljenih je bilo še pet nedoločljivih sestavin in trije homologni metaboliti, vsak od njih je predstavljal približno 4 % skupnega radioaktivnega ostanka (EFSA, 2004).

Razgradnja lasalocida so ugotavljali pri sveže zbranih iztrebkih s koncentracijo lasalocida v iztrebkih 5 in 10 mg/kg (EFSA, 2004). Lasalocid so ugotavljali z modificirano TLC avtobiografsko metodo. Rezultati so pokazali, da se je v tridesetih dneh razgradilo več kot 75 % učinkovine. Ugotovljeno je bilo tudi, da v osušenih iztrebkih ni bilo zaznati padca koncentracije lasalocida. Dodatna raziskava je pokazala, da se je v iztrebkih piščancev, krmljenih s krmo, ki je vsebovala 75 mg/kg lasalocida, povprečno 75 % aktivnosti lasalocida zmanjšalo po 6 do 29 dneh. Iztrebki so bili skladiščeni v pogojih na 32° C in 85 % relativne vlage (EFSA, 2004).

## 2.14 OBNAŠANJE LASALOCIDA V NARAVNEM OKOLJU IN TLEH

Pri uporabi kokcidiostatikov pa se soočamo tudi z njihovim prehajanjem v okolje, možnosti so prikazane na sliki 7. Zato je pomembno, da se seznanimo z obnašanjem lasalocida v različnih materijah naravnega okolja.



Slika 7: Prikaz možnosti/poti prehajanja zdravil v okolje (pridobljeno; 12. 06. 2015, <http://ehp.niehs.nih.gov/1104477>)

Figure 7: Major pathways of pharmaceutical (waste) release into the environment.

### 2.14.1 Biorazgradnja ter vezanje in absorpcija v tleh

Literatura poroča o treh študijah, kjer so proučevali biorazgradnjo lasalocida v tleh, od katerih so pri eni uporabili lasalocid označen s  $C^{14}$ . Obnašanje v tleh so merili z metodama HPLC in TLC ter  $CO_2$  metodo za stopnjo mineralizacije (EFSA, 2004). Tipi zemljin, v katerih so ocenjevali navedene parametre, so bili prav tako peščena glina, silikatna glina in navadna glina. Našli so veliko metabolitov, vendar jih niso uspeli identificirati. Enega od njih, označenega kot »neznan C«, so opazili v koncentraciji večji od 10 % in do 20 % v silikatni glini 32 dan po aplikaciji. Ta koncentracija je padla na 17 % na 120 dan poskusa. Mineralizacija z vezanjem na  $CO_2$  je bila 23 % pri peščeni glini, 15 % pri navadni glini in 11 % pri silikatni glini. Ostanki, ki jih ni bilo mogoče ekstrahirati, so v peščeni glini dosegli 57 % . V peščeni glini je bil 50 % padec aktivnosti ugotovljen po 1,8 dneva, pri navadni glini po 0,6 dneva in pri silikatni glini po 14,2 dneva.

V študiji so proučevali vezanje lasalocida, na silikatno in peščeno glino z različnimi vsebnostmi organskega ogljika ter ilovico z uporabo  $C^{14}$  označenega lasalocida. Pri vseh treh tipih zemljin je bila konstanta vezanja (Freundlichova konstanta) podobna in v mejah od 0,86 do 0,94. Rezultati kažejo, da je lasalocid slabo gibljiv in se močno veže na glino, ki vsebujejo visoko stopnjo organskega ogljika in ilovice (EFSA, 2004).

Z obnašanjem lasalocida v okolju so se ukvarjali tudi slovenski raziskovalci. Ugotovili so, da je količina lasalocida v iztrebkih odvisna od tega, ali se gnoj kompostira ali se skladišči klasično. Pri kompostiranem gnoju je razpolovna doba lasalocida bistveno krajša (17 dni), pri nekompostiranem pa skoraj 62 dni (Žižek s sod., 2015). Posledično se zmanjša tudi razpolovna doba lasalocida v zemlji.

### **2.14.2 Obnašanje v vodi**

Hidrolizo lasalocida so določali pri različnih pH-vrednostih skladno z normativi OECD 111 (EFSA, 2004). Pri vrednosti pH 4 in 7 in temperaturi vode  $50^{\circ}C$ , se je aktivnost zmanjšala za manj kot 10 % v petih dneh, pri pH-vrednosti 9 pa za okoli 32 %. Stabilnost lasalocida so ugotavljali tudi v filtriranih in nefiltriranih fekalnih ekstraktih in odplakah (EFSA, 2004). Po 30 minutah se je v obeh vzorcih fekalnih ekstraktov aktivnost zmanjšala za 90 %, v vzorcih odplak pa je aktivnost ostala med 90 in 80 %, zato se lasalocid ocenjuje kot stabilen v vodi. Zaradi ugotovitve, da je bila zaznana zmanjšana aktivnost enaka pri filtriranem in nefiltriranem fekalnem ekstraktu, ni izključeno, da je bila ta zmanjšana aktivnost prej posledica vezanja lasalocida, kot pa njegove razgradnje (EFSA, 2004).

Premalo pa je na voljo rezultatov študij, da bi lahko ocenili stopnjo razgradnje lasalocida v gnojevki. 50 % stopnja razgradnje lasalocida v tleh je med 0,6 in 14,2 dneva (povprečna vrednost 5,5 dni). Ugotovljen je en večji metabolit, katerega biološka aktivnost je nepoznana. Hidroliza lasalocida je počasna.

Študija, ki je bila opravljena v Sloveniji, je proučevala oceno potencialnega vnosa kokcidiostatkov (monenzina) v okolje na primeru Dravskega polja (Koroša in sod., 2014). Področje je bilo izbrano zaradi prodnatih tal in visoko razvite perutninske proizvodnje. Monenzin je bil izbran kot eden izmed najbolj razširjenih kokcidiostatikov v Sloveniji, za katerega obstaja verjetnost, da se bo pojavil tudi v podzemni vodi. Ugotovili so, da je

potencialna okoljska koncentracija na območju Dravskega polja 3 %, v najslabšem možnem primeru pa 0,30 mg/kg prsti (Koroša in sod., 2014).

### **2.14.3 Vplivi na rastline**

Poročajo o dveh študijah fitotoksičnosti lasalocida iz gnojevke piščancev, ki so bili 8 tednov krmljeni s krmo, ki je vsebovala od 75 do 225 mg/kg lasalocida. V drugi študiji pa je bil lasalocid neposredno zmešan z zemljo v koncentraciji 150 mg/kg zemlje.

Vzorci gnojevke so bili vnešeni v zemljo v količini 10 ton na hektar. Zemljišče je bilo posejano z enokaličnicami, in sicer s koruzo (*Zea mais*), z ječmenom (*Hordeum vulgare*) in s travniško ljujko (*Lolium perenne*) ter dvokaličnicami: sojo (*Glycine max*), paradižnikom (*Lycopersicon esculentum*) in kumaricami (*Cucumis vulgaris*).

V prvi študiji ni bilo mogoče ugotavljati vpliva lasalocida zaradi širokega razpona kalitve. Pri drugi študiji pa niso bili ugotovljeni vplivi na kaljenje. Rastline, ki so bile gnojene z omenjeno gnojevko, so rastle hitreje in imele višjo svežo maso kot rastline z zemlje, ki je bila gnojena z gnojevko brez dodanega lasalocida. Verjetno je bil to vpliv lasalocida v gnojevki, vendar končna sveža masa rastlin z zemljišča, ki je bilo gnojeno z gnojevko brez lasalocida, ni opazno odstopala (EFSA, 2004).

### **2.14.4 Vplivi na nečlenarje in mikroorganizme v zemlji**

Akutno toksičnost lasalocida so proučevali na deževnikih vrste *Eisenia andrei* pri koncentraciji 600 mg/kg suhe zemljine v trajanju 14 dni pri 20° C skladno s smernicami OECD 207 (EFSA, 2004). V študiji so uporabili umetno sestavljeno zemljino iz 70 % peska, 20 % kaolinske gline in 10 % šote. Pri dveh najvišjih koncentracijah lasalocida (300 in 600 mg/kg) so znotraj 14 dni poginile vse živali v poskusu. NOEL za nečlenarje je bil postavljen na 75 mg/kg.

Literatura poroča o ugotavljanju vpliva lasalocida na aerobne mikroorganizme v zemlji. Zaviralne učinke lasalocida na stopnje respiracije aerobnih mikroorganizmov v odpadnih vodah in aktivnem mulju so ugotavljali s tri urnim testom inhibicije respiracije v skladu z OECD 209 pri koncentraciji lasalocida od 10 do 1000 mg na liter zemlje.

Učinki lasalocida na respiracijo in nitrifikacijo so se ugotavljali v peščeni glini s sposobnostjo vezanja vode 40 % skladno s standardom OECD 216 in 217 (EFSA, 2004). Vzorcem zemljine je bil dodan lasalocid v koncentraciji 1,039 in 5 mg/kg. Vzorci so bili 56 dni inkubirani v

aerobnih pogojih v temi pri temperaturi 20° C. Vzorci namenjeni za transformacijo dušika so bili obogateni z 0,5 % lucernine moke. Aktivnost zemeljske respiracije in vsebnost nitratov so ugotavljali v razmikih od 0 do tri ure ter sedmi, 14, 28 in 56 dan. Na 28. dan so povprečne stopnje respiracije pri koncentracijah lasalocida 1 in 5 mg/kg odstopale od kontrolne skupine za 31 do 42 %.

Po 56 dnevih pa je bila stopnja respiracije pri obeh omenjenih koncentracijah višja kot pri kontrolni skupini in sicer za 11 in 22 %. Po 28 dnevih je bila vsebnost nitrata pri koncentraciji lasalocida 1 mg/kg statistično opazno nižja v primerjavi s kontrolno skupino (16 %), nasprotno pa pri koncentraciji 5 mg/kg ni bilo sprememb.

NOEL za učinek lasalocida na mikroorganizme v zemlji je manj kot 5 mg/kg.

#### **2.14.5 Toksičnost za vodne organizme**

Na podlagi podatkov iz literature so bile postavljene vrednosti NOEL za vodne organizme.

Pri algah vrste *Selenastrum subspicatum* so akutno toksičnost ugotavljali pri koncentracijah lasalocida od 0,22 do 10 mg/l skladno s smernicami OECD 201 (EFSA, 2004).

Na podlagi stopnje rasti in biomase v 72 urah je bil postavljen NOEL, ki znaša 1,0 mg /l.

Pri rakah vrste *Daphnia magna* so akutno toksičnost ugotavljali pri koncentraciji lasalocida od 1,5 do 32 mg/l.

Pri ribah je bila ugotovljena najnižja toksičnost pri 2,5 mg lasalocida na liter. Z upoštevanjem 1000 – kratnega faktorja varnosti je NOEL 2,5 µg/l.

### **2.15 JAJCA V PREHRANI IN PODATKI O PROIZVODNJI IN POTROŠNJA JAJC TER PERUTNINSKEGA MESA V SLOVENIJI IN EU**

Jajca predstavljajo v prehrani ljudi pomemben vir hranilnih snovi, saj vsebujejo visoko kakovostne beljakovine, maščobe, vitamin D, vitamin B12, selen in druge minerale ter holin. So polnovredno živilo z nizko kalorično vrednostjo in so relativno poceni. Srednje veliko jajce ima 78 kcal (kilokalorij) in vsebuje 6,5 gramov beljakovin ter 5,8 gramov maščob (od tega je 2,3g enkrat nasičenih maščob). Jajce je zgrajeno iz rumenjaka, beljaka, celične ovojnice, zračnega mehurčka in lupine; kemijska sestava pa je naslednja: 65,6 % vode, 12,1 % beljakovin,



10,5 % maščobe, 10,9 % pepela in 0,95 % ogljikovih hidratov. Povprečna masa srednje velikega jajca je 60 gramov, od tega je 17,4 gramov (29 %) rumenjaka, 36,9 gramov (61,5 %) beljaka in 5,6 gramov (9,5 %) jajčne lupine (Berlitz in Grosch, 1999; Domingo, 2014).

V mnogih državah (zlasti na bližnjem vzhodu) pa se jajčni folikli uporabljajo tudi kot samostojno živilo in veljajo za delikateso. Zaradi njihove ponudbe na trgu je pomembno, da so potrošniki osveščeni tudi o morebitnih ostankih lasalocida v jajčnih foliklih, v kolikor je le-ta prisoten v krmi kokoši. Na sliki 8, prikazujemo jajčne folikle v notranjosti trupa kokoši ter različne načine pakiranja jajčnih foliklov in njihovo ponudbo na trgu, kjer so pripravljeni za potrošnika (slike 9, 10, 11).



**Slika 8:** Jajčni folikli v notranjosti trupa kokoši (<https://www.flickr.com>, pridobljeno 13. 12. 2014).

**Figure 8:** Egg follicles in the hull of laying hens.



**Slika 9:** Pakirani jajčni folikli, pripravljene za potrošnika,  
(<http://alittlebitofchristo.blogspot.com/2010/01/get-my-groove-on.html>, pridobljeno 10. 06. 2015).

**Figure 9:** Packaged egg follicles prepared for the consumer.



**Slika 10:** Jajčni folikli pakirani kot živilo (<https://www.flickr.com>, pridobljeno, 13. 12. 2014)

**Figure 10:** Egg follicles packed as food.



**Slika 11:** Folikli kot živilo (<http://www.grubstreet.com/>, pridobljeno 13. 12. 2014).

**Figure 11:** Egg follicles as food.

V Sloveniji je prireja perutninskega mesa stabilna in predstavlja skoraj dve tretjini prireje mesa. V letih med 2008 do 2012 je bila prireja v povprečju 60 ton letno, medtem ko je poraba perutninskega mesa v povprečju 56 ton. Potrošnja na prebivalca znaša 27 kg letno (Statistični urad Republike Slovenije, 2014a).

Proizvodnja jajc obsega proizvodnjo valilnih in drugih jajc oziroma jajc za prehrano. V povprečju je bilo v obdobju 2008 do 2012 proizvedeno 21 ton jajc letno, potrošnja za prehrano pa 20 ton, kar je skoraj 10 kg na prebivalca (Statistični urad Republike Slovenije 2014b).

V EU (upoštevajoč 27 DČ) je bila v letu 2011 proizvodnja perutninskega mesa 12.385.300 ton, od tega je bilo kar 60 % celotne proizvodnje pridelano v petih DČ (Francija, Velika Britanija, Španija, Nemčija in Poljska).

Proizvodnja jajc v EU znaša 6,9 milijonov ton na leto. Povprečna potrošnja na prebivalca je 12 kg na leto. Največ jajc proizvedejo v Franciji in Španiji, sledijo Italija, Nemčija, Nizozemska in Velika Britanija.

(<http://www.compassionlebensmittelwirtschaft.de/media/5789260/laying-hens-egg-production-in-the-eu.pdf>: , pridobljeno 16. 12. 2014).

### **3. MATERIALI IN METODE DE LA**

#### **3.1 POSKUSI NA ŽIVALIH IN POGOJI REJE**

Poskusi so bili opravljeni na več skupinah lahkih kokoši nesnic pasemskega tipa Hisex brown, ki so bile kupljene na farmi Jata Emona d.d. Za opravljanje poskusa na nesnicah je bilo predhodno pridobljeno dovoljenje Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Veterinarske uprave Republike Slovenije, številka 34401-55/2008/4, z dne 08. 10. 2008. Z dovoljenjem so bili opredeljeni tudi pogoji za opravljanje poskusa, ki so v celoti upoštevali dobro počutje živali v poskusu. Poskusi so potekali v eksperimentalnem hlevu Inštituta za zdravstveno varstvo perutnine, Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Vse živali so bile pred začetkom poskusa klinično pregledane in niso kazale nobenih znakov bolezni. Kokoši nesnice so bile vhlevljene v globok nastil, ki je bil sestavljen iz mešanice žaganja in oblancev, ločeno po skupinah, skladno z načrtom dinamike poskusa. Krmili in napajali smo jih ad libidum. Splošni zoohigijski pogoji v hlevu so bili: temperatura od 18° C do 21° C in relativna vlaga med 65 in 70 %.

Kot kontrolno skupino pri vsakem poskusu, smo obravnavali vse kokoši v času prilagajanja na poskus, to je pet dni za prvi in drugi poskus, ter dva dni za tretji poskus. Kokoši so v tem času dobivale krmo brez lasalocida, nato smo jih naključno razdelili v poskusne skupine.

Vse poskusne skupine kokoši so sedem dni prejemale krmno mešanico z dodanim lasalocidom v različnih koncentracijah.

Jajca in vzorce iztrebkov smo zbirali od samega začetka poskusa, vzorce ostalih tkiv in jajčnih foliklov smo od žrtvovanih kokoši odvzeli skladno z načrtom posameznega poskusa, kar je podrobneje navedeno v nadaljevanju pri opisu posameznega poskusa. Živali za žrtvovanje smo odbirali po metodi naključnega vzorčenja. Kokoši so bile žrtvovane z intravenozno aplikacijo preparata T-61. Prikaz vzorčenja in žrtvovanja kokoši pri poskusih krmljenja z lasalocidom, vrste vzorcev, koncentracijo lasalocida v krmi, časa trajanja poskusa in število živali v poskusu prikazujemo v preglednici 8.

**Preglednica 8:** Prikaz vzorčenja in žrtvovanja kokoši pri poskusih krmljenja z lasalocidom; vrste vzorcev, koncentracija lasalocida v krmi, časa trajanja poskusa in število živali v poskusu.

**Table 8:** Table shows sampling and sacrificing of laying hens at feeding experiment with lasalocid; types of samples, the concentration of lasalocid in feed, duration and the number of animals in the experiment.

	<b>Poskus 1</b> <b>Konc. lasalocida 5,7 mg/kg; 21 dni,</b> <b>24 kokoši</b>	<b>Poskus 2</b> <b>Konc. lasalocida 3,2 mg/kg, 30</b> <b>kokoši; 12 dni</b>	<b>Poskus 3</b> <b>Konc. lasalocida 1,1 mg/kg, 12 dni</b>	
			Poskus A, 24 kokoši	Poskus B, 30 kokoši
<b>Jetra</b>	7*, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21	1*, 2*, 3*, 4*, 5*, 6*, 7*, 9, 10, 11, 12	4*, 5*, 6*, 7*, 8, 9, 10, 11, 12	
<b>Ledvica</b>	7*, 9, 11, 13, 15, 17, 19	1*, 2*, 3*, 4*, 5*, 6*, 7*, 9, 10, 11, 12		
<b>Mišično tkivo</b>	7*, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21			
<b>Abdominalna maščoba</b>	7*, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21			
<b>Koža z maščobo</b>	7*, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21	1*, 2*, 3*, 4*, 5*, 6*, 7*, 9, 10, 11, 12	4*, 5*, 6*, 7*, 8, 9, 10, 11	
<b>Jajčni folikli</b>	7*, 21	7*	5*, 6*, 7*, 8, 9, 10, 11, 12	
<b>Iztrebki (2 vzorca dnevno)</b>	1*, 2*, 3*, 4*, 5*, 6*, 7*, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21	1*, 2*, 3*, 4*, 5*, 6*, 7*, 8, 9, 10, 11, 12	1*, 2*, 3*, 4*, 5*, 6*, 7*, 8, 9, 10, 11, 12	1*, 2*, 3*, 4*, 5*, 6*, 7*, 8, 9, 10, 11, 12
<b>Žrtvovanje kokoši (število živali dnevno)</b>	7* (6 živali); 9 (3 živali); 11 (4 živali); 13, 15, 17, 19 in 21 (po 2 živali)	1*, 2*, 3*, 4*, 5*, 6* (2 živali); 7* (6 živali); 9 (4 živali); 11 in 12 (2 živali)	4*, 5*, 6* (2 živali); 7* (5 živali); 8 (4 živali); 9 (3 živali); 10 in 11 (2 živali)	5* (2 živali); 6* (3 živali); 7*, 8, 9, 10 (po 4 živali); 11 (7 živali) in 12 (2 živali)
<b>Jajca (število jajc dnevno)</b>	1* in 2* (po 12 jajc); 3*; 4* in 5* (po 15 jajc); 6* (14 jajc), 7* (15 jajc); 8 (14 jajc); 9 in 10 (po 12 jajc); 11 (9 jajc); 12; 13 in 14 (po 8 jajc); 15 (6 jajc); 16 in 17 (po 5 jajc), 18 (4 jajca); 19 in 20 (po 2 jajci) in 21 (4 jajca)	1* (12 jajc); 2* (14 jajc); 3* in 4* (po 10 jajc); 5* (12 jajc); 6* (14 jajc), 7* (15 jajc); 8 (10 jajc); 9 in 10 (po 6 jajc); 11 (2 jajci) in 12 (3 jajca)	1* in 2* (po 22 jajc); 3* (6 jajc); 4* (20 jajc); 5* (9 jajc); 6* (21 jajc); 7* (8 jajc); 8 (15 jajc); 9 (10 jajc); 10 (8 jajc); 11 (4 jajca) in 12 (1 jajce)	1* (14 jajc); 2* (8 jajc); 3*; 4* in 5* (po 11 jajc); 6* (14 jajc); 7* (7 jajc); 8 (10 jajc); 9 (8 jajc); 10 in 11 (po 5 jajc) in 12 (4 jajca)

\*dnevi krmljenja z lasalocidom

### **3.1.1 Poskus 1, koncentracija lasalocida v krmi 5,7 mg/kg**

V poskus je bilo vključenih štiriindvajset živali lahkih rjavih nesnic. Živali so se na poskus prilagajale pet dni, sam poskus pa je trajal 21 dni. Pri načrtovanju poskusa smo se odločili, da bomo za prvi poskus krmi dodali 6 mg lasalocida/kg, kar je polovična vsebnost od 10 % (12,5 mg lasalocida/kg krme) od najvišje stopnje nenamerne navzkrižne kontaminacije, ki jo je v svoji študiji uporabila EFSA. Analiza vzorca krme je pokazala vsebnost 5,7 mg lasalocida /kg krme. Skupina kokoši je dobivala osnovno krmo NSK-1 (končna krma za nesnice) z dodatkom lasalocida v koncentraciji 5,7 mg/kg krme, kar predstavlja približno 5% (4,6 %) vsebnost glede na predpisano najvišjo terapevtsko dozo (125 mg/kg) za piščance in purane.

Kot aktivna komponenta krmila je bil uporabljen preparat Avatec (E763, proizvodna številka: 710140, številka lota: AV71317, junij 2007- maj 2010), ki je vseboval 14,45% lasalocida (analizna številka 08/5452, z dne 07. 11. 2008). Skupno je bilo pripravljeno 25 kg krme.

Pred začetkom krmljenja z lasalocidom je bilo odvzetih 12 jajc, dva vzorca iztrebkov, ter vzorec krme z in brez dodanega lasalocida (datum analize: 14.11.2007; NSK-1 za lasalocidom 5,7mg lasalocida/kg krme; NSK-1 < 1,2 mg lasalocida/kg krme). Živali so sedem dni dobivale krmo, ki je vsebovala lasalocid in še štirinajst dni krmo brez lasalocida.

#### 3.1.1.1. Žrtvovanje živali in odvzem vzorcev

Kokoši so bile žrtvovane z intravenozno aplikacijo preparata T-61. Sedmi dan poskusa smo opravili prvo žrtvovanje šestih kokoši, deveti dan smo žrtvovali tri, enajsti dan štiri ter trinajsti, petnajsti, sedemnajsti, devetnajsti in enaindvajseti dan po dve živali. Žrtvovanim živalim smo odvzeli naslednje vzorce: jetra, ledvica, mišično tkivo, abdominalno maščobo, kožo z maščobo in jajčne folikle. Vzorce smo označili in zamrznili na temperaturo manj kot – 18° C do dneva analize.

#### 3.1.1.2. Vzorčenje jajc in iztrebkov

Jajca smo zbirali dnevno, jih razbili, ločeno shranili rumenjake in beljake ter jih zamrznili na temperaturo manj kot – 18° C do dneva analize.

Prav tako so bili v času trajanja poskusa odvzeti vzorci iztrebkov, po dva vzorca na dan.

### **3.1.2 Poskus 2, koncentracija lasalocida v krmi 3,2 mg/kg**

V poskus je bilo vključenih trideset živali lahkih rjavih nesnic. Živali so se na poskus prilagajale pet dni. Poskus je trajal 12 dni. Pri načrtovanju poskusa smo se odločili, da bomo za drugi poskus krmi dodali 3 mg lasalocida/kg, kar je polovična vsebnost od 5 % (6, 2 mg lasalocida/kg krme) stopnje nenamerne navzkrižne kontaminacije, ki jo je v svoji študiji uporabila EFSA. Analiza vzorca krme je pokazala vsebnost 3,2 mg lasalocida/kg krme.

Skupina kokoši je dobivala osnovno krmo NSK-1 (končna krma za nesnice) z dodatkom lasalocida v koncentraciji 3,2 mg/kg krme, kar predstavlja 2,6 % vsebnost, glede na najvišjo terapevtsko dozo za piščance in purane (analizna št. 08/5141, z dne 17. 4. 2008, NSK-1 brez lasalocida <1,2 mg lasalocida/kg krme, analizna št. 08/5140, z dne 17. 4. 2008). Skupno je bilo pripravljeno 30 kg krme z dodatkom lasalocida.

Kot aktivna komponenta krmila je bil uporabljen preparat Avatec (E763, proizvodna številka: 710140, številka leta: AV71317, junij 2007- maj 2010), ki je vseboval 14,45 % lasalocida (analizna številka 08/5139, z dne 17. 4. 2008).

Pred začetkom krmljenja z lasalocidom smo žrtvovali dve živali, jima odvzeli tkiva, jih označili in zamrznili na temperaturo manj kot – 18° C do dneva analize.

Odvzeli smo tudi 12 komadov jajc, dva vzorca iztrebkov in vzorec krme z in brez dodanega lasalocida.

#### **3.1.2.1. Žrtvovanje živali in odvzem vzorcev**

Kokoši so bile žrtvovane z intravenozno aplikacijo preparata T-61. Od prvega do šestega dne poskusa smo vsak dan žrtvovali dve živali, sedmi dan smo žrtvovali šest živali, deveti dan štiri in enajsti ter dvanajsti dan po dve živali. Kokošim smo odvzeli jetra, ledvica, kožo z maščobo in jajčne folikle, jih označili in zamrznili na temperaturo manj kot – 18° C do dneva analize.

#### **3.1.2.2. Vzorčenje jajc in iztrebkov**

Dnevno smo zbirali jajca, jih razbili, ločeno shranili rumenjake in beljake ter jih zamrznili na temperaturo manj kot – 18 ° C do dneva analize.

Prav tako so bili v času trajanja poskusa odvzeti vzorci iztrebkov, po dva vzorca na dan.

### **3.1.3 Poskus 3a, koncentracija lasalocida v krmi 1,1mg/kg**

V poskus je bilo vključenih štiriindvajset kokoši lahkih rjavih nesnic. Živali so se na poskus prilagajale dva dni, sam poskus je trajal 12 dni. Pri načrtovanju poskusa smo se odločili, da bomo za zadnji poskus krmi dodali 1,25 mg lasalocida/kg, kar je polovična vsebnost od 2 % (2,5 mg lasalocida/kg krme) stopnje nenamerne navzkrižne kontaminacije, ki jo je v svoji študiji uporabila EFSA.

Skupina je dobivala osnovno krmo NSK-1 (končna krma za nesnice) z dodatkom lasalocida 1,1 mg/kg krme, kar je blizu vsebnosti 1 % (0,9 %), glede na najvišjo predpisano terapevtsko dozo za piščance in purane. Skladno z Direktivo EK 2009/8 je to dovoljena vsebnost lasalocida v krmi za neciljne živali, ki je nastala kot posledica nenamerne navzkrižne kontaminacije (Direktiva Komisije 2009/8).

Kot aktivna komponenta krmila je bil uporabljen preparat Avatec (E763, proizvodna številka: 710140, številka lota: AV71317, junij 2007- maj 2010), ki je vseboval 14,45 % lasalocida (analizna številka 08/5452, z dne 07. 11. 2008). Pripravljeno je bilo 26 kg krme.

Analiza krme: NSK-1 z lasalocidom 1,1 mg/kg  $\pm$  0,02 mg/kg (št. izvida 08/5454).

NSK-1 < 0,8 mg lasalocida/kg krme (št. izvida 08/5453).

Pred začetkom krmljenja z lasalocidom smo odvzeli 6 jajc, dva vzorca iztrebkov ter vzorec krme z in brez dodanega lasalocida.

#### 3.1.3.1. Žrtvovanje živali in odvzem vzorcev

Kokoši so bile žrtvovane z intravenozno aplikacijo preparata T-61. Od četrtega do šestega dne poskusa smo žrtvovali po tri živali dnevno, sedmega dne pet živali, osmi dan štiri, deveti dan tri, ter deseti in enajsti dan po dve živali.

Žrtvovanim kokošim smo odvzeli jetra, kožo z maščobo in jajčne folikle, jih označili in zamrznili na temperaturo manj kot  $-18^{\circ}\text{C}$  do dneva analize.

#### 3.1.3.2. Vzorčenje jajc in iztrebkov

Dnevno smo zbirali jajca, jih razbili, ločeno shranili rumenjake in beljake in jih zamrznili na temperaturo manj kot  $-18^{\circ}\text{C}$  do dneva analize.

Prav tako so bili v času trajanja poskusa odvzeti vzorci iztrebkov, po dva vzorca na dan.



### **3.1.4 Poskus 3 b, koncentracija lasalocida v krmi 1,1mg/kg**

V poskus je bilo vključenih 30 kokoši lahkih rjavih nesnic. Kokoši so se na poskus prilagajale dva dni, sam poskus je trajal 12 dni. Skupina je sedem dni dobivala osnovno krmo NSK-1 (končna krma za nesnice) z dodatkom lasalocida 1,1 mg/kg krme ( $\pm 0,02$  mg/kg). Skupno je bilo pripravljeno 30 kg krme. Za ponovitev poskusa z enako koncentracijo lasalocida v krmi smo se odločili zaradi zagotovitve zadostnega števila vzorcev rumenjakov in jajčnih foliklov za nadaljnje analize.

Kot aktivna komponenta je bil uporabljen preparat Avatec (E763, proizvodna številka: 710140, številka lota: AV71317, junij 2007 – maj 2010), ki je vseboval 14,45 % lasalocida (analizna številka 08/5452, z dne 07. 11. 2008) .

Analiza krme: NSK-1 z lasalocidom	1,1 mg/kg $\pm$ 0,02 mg/kg
NSK-1	< 0,8 mg lasalocida/kg krme

Pred začetkom krmljenja z lasalocidom smo odvzeli 6 jajc, dva vzorca iztrebkov ter vzorec krme z in brez dodanega lasalocida.

#### 3.1.4.1. Žrtvovanje živali in odvzem vzorcev

Kokoši so bile žrtvovane z intravenozno aplikacijo preparata T-61. Peti dan poskusa smo žrtvovali dve živali, šesti dan tri živali, od sedmega do desetega dneva po štiri kokoši, enajsti dan sedem kokoši in dvanajsti dan dve kokoši. Žrtvovanim kokošim smo odvzeli jetra, kožo z maščobo in jajčne folikle, jih označili in zamrznili na temperaturo manj kot  $-18^{\circ}$  C do dneva analize.

#### 3.1.4.2. Vzorčenje jajc in iztrebkov

Dnevno smo zbirali jajca, jih razbili, ločeno shranili rumenjake in beljake in jih zamrznili na temperaturo manj kot  $-18^{\circ}$  C do dneva analize.

Prav tako so bili v času trajanja poskusa odvzeti vzorci iztrebkov, po dva vzorca na dan.

### **3.1.5 Standardne raztopine**

Lasalocid Na (Alpharma, kat. št. TC 00-007-62 ali ekv.) smo uporabljali za določanje vsebnosti lasalocida v krmi. Osnovno standardno raztopino lasalocida, koncentracija okoli 1 mg/ml, smo pripravili v nakisanem metanolu, uporabljali smo sveže pripravljeno raztopino. Delovne standardne raztopine lasalocida, koncentracije npr. 0,12, 0,24 in 0,36 µg/ml oz. 5, 10 in 20 µg/ml, smo pripravljali z razredčevanjem osnovne standardne raztopine lasalocida z nakisanim metanolom. Vedno smo pripravljali sveže raztopine.

Za določanje vsebnosti lasalocida v tkivih in jajcih smo uporabljali standard Na-lasalocid proizvajalca Riedel de Haën (Vetranal št. 46372 in 33339, Nemčija). Osnovno standardno raztopino lasalocida koncentracije 0,2 mg/ml smo pripravili v etanolu. Delovne standardne raztopine lasalocida smo pripravljali z redčenjem v acetonitrilu. Vse pripravljene raztopine so bile stabilne eno leto, hranjene v temi in v hladilniku pri temperaturi do 2° C.

Kot interni standard smo uporabljali natrijevo sol nigericina, proizvajalca Fluka (št. 72445, Nemčija). Za pripravo osnovne standardne raztopine koncentracije 0,2 mg/ml smo sol raztopili v etanolu. Delovne standardne raztopine smo pripravljali z redčenjem v acetonitrilu. Raztopine, hranjene v temi in v hladilniku so bile stabilne eno leto.

Za določanje vsebnosti lasalocida v iztrebkih smo uporabljali standard Na-lasalocid proizvajalca Riedel de Haën (Vetranal št. 46372 in 33339, Nemčija). Osnovno standardno raztopino lasalocida koncentracije 1,0 mg/ml smo pripravljali v metanolu. Za pripravo delovnih standardnih raztopin za meritve smo osnovno raztopino redčili v metanolu, za pripravo raztopin za standardne dodatke matrici pa smo osnovno standardno raztopino redčili z izooktanom. Delovne standardne raztopine hranjene v hladilniku so bile obstojne 14 dni.

### **3.1.6 Reagenti**

- acetonitril čistosti ultra grade HPLC grade,
- deionizirana voda z upornostjo 18 MΩ,
- diklorometan p.a.,
- etanol čistosti HPLC-gradient grade,
- etilacetat, p.a.,
- izooktan, p.a.,
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, p.a.,

- klorovodikova kislina, p.a.,
- metanol, p.a.,
- metanol čistosti HPLC,
- mravljična kislina čistosti p.a.,
- natrijev acetat, p.a.,
- n-heksan čistosti ultra resi-analyzed,
- očetna kislina, p.a.
- ortofosforna kislina, 85 %,
- 6-metil-2-heptilamin.

### **3.1.7 Raztopine**

Nakisani metanol smo pripravili tako, da smo 5,0 ml klorovodikove kisline razredčili na 1000 ml z metanolom. Vedno smo pripravili svežo raztopino.

20 % raztopino ortofosforne kisline smo pripravili tako, da smo 23,5 ml ortofosforne kisline razredčili na 100 ml z deionizirano vodo.

Raztopino fosfatnega pufru ( $c = 0,01 \text{ mol/l}$ ) smo pripravili z raztapljanjem 1,36 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  v 500 ml deionizirane vode. Dodali smo 3,5 ml ortofosforne kisline in 10,0 ml 6-metil-2-heptilamina. Z raztopino ortofosforne kisline smo uravnali pH na 4,0 in dopolnili z deionizirano vodo do 1000 ml.

Raztopino acetatnega pufru ( $c = 0,01 \text{ mol/l}$ ) s pH 4,0 smo pripravili tako, da smo dodajali očetni kislini natrijev acetat (oba 0,01 mol/l) dokler nismo dosegli vrednosti pH 4,0.

Za meritve krme s tekočinsko kromatografijo s fluorescenčno detekcijo smo pripravili mobilno fazo na sledeči način: 50 ml fosfatnega pufru smo zmešali z 950 ml metanola.

Za določanje lasalocida v iztrebkih s tekočinsko kromatografijo s fluorescenčno detekcijo smo pripravili mobilno fazo z mešanjem 850 ml metanola in 150 ml acetatnega pufru (pH 4,0).

Za meritve s tekočinsko kromatografijo z masno detekcijo smo pripravili dve mobilni fazi: 0,1 % mravljično kislino v acetonitrilu in 0,1 % mravljično kislino v vodi.

### **3.1.8 Steklovina in potrošni material**

Poleg običajne laboratorijske steklovine in materiala smo potrebovali še:

- 15 ml plastične centrifugirke z navojem in zamaškom,
- temne vialne za tekočinsko kromatografijo,
- konusne vialne za tekočinsko kromatografijo,
- 13 mm in 4 mm PTFE filtri z 0,45 µm porami,
- pribor za filtriranje mobilne faze,
- kolone za ekstrakcijo na trdni fazi s silikagelskim polnilom, LiChrolut Si (Merck št. 2024).

### **3.1.9 Aparature**

- Centrifuga,
- centrifuga s hlajenjem,
- evaporator za izparevanje pod dušikom,
- horizontalni stresalnik,
- homogenizator Ultra-Turrax,
- mlin za vzorce krme,
- mlin za homogenizacijo bioloških vzorcev,
- pH-meter,
- sistem za ekstrakcijo trdno-tekoče,
- stresalna vodna kopel,
- stresalnik,
- tehtnica ( $\pm 0,00001$  g),
- tehtnica ( $\pm 0,001$  g),
- ultrazvočni čistilnik.

### **3.1.10 Instrumenti**

#### **3.1.10.1. Sistem za tekočinsko kromatografijo s fluorescenčno detekcijo**

- Tekočinski kromatograf visoke ločljivosti Waters Alliance 2695 (Waters, MA, ZDA) so sestavljali:
  - o kvarтерна črpalka,
  - o razplinjevalec mobilne faze,
  - o avtomatski vzorčevalnik,
  - o termostat za analitsko kolono,
  - o avtomatski vzorčevalnik,
  - o termostat za analitsko kolono.
  
- Detektor: fluorescenčni detektor Waters 2475 (Waters, MA, ZDA).
- Računalniški program Millennium za vodenje aparature in obdelavo rezultatov.

#### **3.1.10.2. Sistem za tekočinsko kromatografijo z masno detekcijo**

- Tekočinski kromatograf visoke ločljivosti Waters Alliance 2695 so sestavljali:
  - o kvarтерна črpalka,
  - o razplinjevalec mobilne faze,
  - o termostatiran avtomatski vzorčevalnik,
  - o termostat za predkolono ter analitsko kolono.
- Detektor: Tandemski kvadrupolni masni detektor z elektro-spray ionizacijo Quattro micro API Mass Spectrometer (Waters Micromass).
- Integracijski sistem za obdelovanje podatkov TargetLinx.

### **3.1.11 Določanje lasalocida v krmi**

Ob upoštevanju vsebin Direktive Sveta (EC) 1999/76 in Uredbe Komisije (ES) št. 152/2009, je bila za določanje ostankov lasalocid natrija v krmi uporabljena uradna metoda, objavljena v Direktivi Komisije, št. 1999/76 oz. Pravilniku o uradnih metodah analiz krme, dodatkov in premiksov (Ur. list RS, št. 70/2005, Priloga 2, metoda 42).

#### 3.1.11.1. Priprava vzorcev krme

V 250 ml ekstrakcijsko bučko smo zatehtali 10,0 g zmletega vzorca krme, dodali 100 ml nakisanega metanola in stresali na vodni kopeli 20 minut pri temperaturi 40° C. Bučko smo ohladili na sobno temperaturo in pustili stati, da so se vzorci usedli. Ekstrakt smo prenesli v vijalo za tekočinsko kromatografijo. Pred merjenjem smo ga centrifugirali.

#### 3.1.11.2. Pogoji tekočinske kromatografije s fluorescenčno detekcijo

Za meritve lasalocida v krmi smo uporabljali izokratsko kromatografijo. Analitska kolona Hypersil ODS, 5 µm, 250 x 4,6 mm (Agilent, kat. št. 7991618-584), je bila na sobni temperaturi, pretok mobilne faze pa je bil 2 ml/min. Injicirali smo po 20 µl vzorca. Ekscitacijska valovna dolžina na fluorescenčnem detektorju je bila 310 nm, emisijska pa 419 nm.

#### 3.1.11.3. Karakteristike metode

Meja zaznave (LOD) uporabljene metode je bila 1,2 mg/kg, LOQ 4,7 mg/kg, izkoristek 100,6 % in merilna negotovost pri koncentraciji 100 mg/kg pa ± 5 mg/kg.

### **3.1.12 Določanje lasalocida v bioloških vzorcih**

Za ugotavljanje ostankov lasalocida v rumenjaki, jajčnih folikli, beljaki, mišičnem tkivu, jetrih, ledvicah, abdominalni maščobi in koži z maščobo je bila uporabljena metoda tekočinske kromatografije z masno detekcijo (LC-MS/MS), ki omogoča določitev zelo nizkih vsebnosti lasalocida. Za ekstrakcijo in čiščenje vzorcev smo vpeljali metodo z minimalno porabo organskih topil, zato smo se odločili, da bomo sledili postopku, ki ga uporabljajo v Centralnem referenčnem laboratoriju za ostanke veterinarskih zdravil v Berlinu (Confirmatory method for the determination of nicarbazin, monensin, salinomycin, lasalocid, narasin and maduramycin in muscle and liver with LC-MS/MS). Omenjeni postopek smo prilagodili opremljenosti našega laboratorija in uvedli nekatere spremembe.

#### 3.1.12.1. Ekstrakcija in čiščenje vzorcev

##### 3.1.12.1.1. Jajčni rumenjaki, beljaki in jajčni folikli

Odtehtanemu vzorcu smo dodali interni standard (nigericin) in 30 sekund stresali na stresalniku, nato smo pustili vzorec stati 15 minut. Sledila je ekstrakcija lasalocida v 10 ml acetonitrila z

enominutnim stresanjem na stresalniku in 10 minutnim na horizontalnem stresalniku pri sobni temperaturi. Ekstrakt smo od vzorca ločili z deset minutnim centrifugiranjem pri hitrosti 4000 obratov na minuto in temperaturi 4° C. Organsko fazo smo oddekantirali v novo epruveto in pustili čez noč v zamrzovalniku. Naslednji dan smo vsebino prelili v čisto epruveto in sušili pod tokom dušika pri 65° C do suhega. Suhi ostanek smo raztopili v 1 ml heksana, premešali s stresalnikom in postavili v ultrazvočno kopel za eno minuto. Iz heksana smo lasalocid ekstrahirali z nežnim ročnim mešanjem v mešanico topil acetonitril/voda (50/50, v/v). Sledilo je desetminutno centrifugiranje pri hitrosti 4000 obratov na minuto in temperaturi 4° C. Heksansko zgornjo fazo smo zavrgli, acetonitrilno pa filtrirali preko 0,45 µm filtra v vialo.

Mase vzorcev in končni volumni so bili odvisni od vsebnosti lasalocida v vzorcu. Pri analizi beljakov smo odtehtali po 2 g vzorca, končni volumen acetonitril/vode (50/50, v/v) je bil 500 µl. Za določanje lasalocida v rumenjaki in jajčnih folikli z majhnimi vsebnostmi lasalocida smo natehtali po 2 g vzorca, končni volumni pa so bili 500 µl. Za določanje lasalocida v rumenjaki in jajčnih folikli z večjimi vsebnostmi lasalocida, smo natehtali po 1 g vzorca, končni volumni acetonitril/vode (50/50, v/v) pa so bili po potrebi en ali pet mililitrov. Pri določanju lasalocida v manjših jajačnih folikli smo analizirali cele folikle.

#### 3.1.12.1.2. Abdominalna maščoba in koža z maščobo

Odtehtanemu vzorcu (1 g) smo dodali interni standard in 30 sekund stresali na stresalniku, nato smo pustili vzorec stati 10 minut. Sledila je ekstrakcija lasalocida v 10 ml acetonitrila z enominutnim stresanjem na stresalniku in 15–minutnim na horizontalnem stresalniku pri sobni temperaturi. Ekstrakt smo od vzorca ločili z desetminutnim centrifugiranjem pri hitrosti 4000 obratov na minuto in temperaturi 4° C. Organsko fazo smo oddekantirali v novo epruveto in pustili čez noč v zamrzovalniku. Naslednji dan smo vsebino prelili v čisto epruveto in sušili pod tokom dušika pri 65° C do suhega. Suhi ostanek smo raztopili v 1 ml heksana, premešali s stresalnikom in postavili v ultrazvočno kopel za eno minuto. Iz heksana smo lasalocid ekstrahirali z nežnim ročnim mešanjem v 500 µl mešanice topil acetonitril/voda (50/50, v/v). Sledilo je deset minutno centrifugiranje pri hitrosti 4000 obratov na minuto in temperaturi 4° C. Heksansko zgornjo fazo smo zavrgli, acetonitrilno pa filtrirali preko 0,45 µm filtra v vialo.

#### 3.1.12.1.3. Mišično tkivo

Odtehtanemu vzorcu (2 g) smo dodali 10 ml acetonitrila in interni standard, nato smo pustili vzorec stati 10 minut. Vzorec smo nato 40 sekund homogenizirali z Ultra Turraxom. Sledilo je centrifugiranje pri 4° C (10 min, 4000 obr/min). Centrifugirane vzorce smo postavili čez noč v zamrzovalnik. Pred nadaljevanjem smo organsko fazo oddekantirali v čisto epruveto in posušili vsebino do suhega pod tokom dušika (65° C). Suhi ostanek smo raztopili v 1 ml heksana (stresalnik, ultrazvočna kopel 1 min). Iz heksana smo lasalocid ekstrahirali z nežnim ročnim mešanjem v 500 µl mešanico topil acetonitril/voda (50/50, v/v). Po desetminutnem centrifugiranju (4000 obr/min, 4° C) smo heksansko fazo zavrgli, acetonitrilno pa filtrirali preko 0,45 µm filtra v vialo.

#### 3.1.12.1.4. Jetra, ledvice

Odtehtanemu vzorcu (1 ali 2 g za jetra, 1 g za ledvice) smo dodali interni standard in pustili vzorec stati 10 minut, nato smo dolili 10 ml acetonitrila. Sledilo je enominutno stresanje na stresalniku in 15–minutno na horizontalnem stresalniku pri sobni temperaturi. Nato smo vzorce centrifugirali pri 4° C (10 min, 4000 obr/min). Centrifugirane vzorce smo postavili čez noč v zamrzovalnik. Pred nadaljevanjem smo organsko fazo oddekantirali v čisto epruveto in posušili vsebino do suhega pod tokom dušika (65° C). Suhi ostanek smo raztopili v 1 ml heksana (stresalnik, ultrazvočna kopel 1 min). Iz heksana smo lasalocid ekstrahirali z nežnim ročnim mešanjem v 500 µl mešanico topil acetonitril/voda (50/50, v/v). Po desetminutnem centrifugiranju (4000 obr/min, 4° C) smo heksansko fazo zavrgli, acetonitrilno pa filtrirali preko 0,45 µm filtra v vialo.

#### 3.1.12.2. Pogoji meritev z uporabo LC-MS/MS

Za določanje lasalocida v bioloških vzorcih smo uporabili analitsko kolono Symmetry, C18, 3,5µm, 2.1 x 50 mm (Waters, MA, ZDA) s predkolono, Symmetry, C18, 3,5µm, 2.1 x 10 mm (Waters, MA, ZDA). Uporabljali smo gradientno kromatografijo, začeli smo s 100 % vodno fazo, po 7 minutah smo prešli na 100 % organsko fazo in pri 16 minutah ponovno vzpostavili začetno stanje. Ločba je potekala 20 minut, pri pretoku 0,3 ml/min in temperaturi analitske kolone in predkolone 40,0 °C. Injekcijski volumen je bil 10 µl, vzorci so bili termostatorirani na vzorčevalniku na temperaturi 5,0° C. Na masnem detektorju so bili postavljeni sledeči osnovni pogoji: ionizacija ESI+, kapilarna napetost 3,2 kV, temperatura izvora 120° C, desolvacijska



temperatura 350° C, pretok plina na stožcu 100 L/uro, pretok desolvacijskega plina 800 L/uro, CID plin je bil argon  $3,2 \times 10^{-3}$  barr. Merjene masne prehode in ostale pogoje podajamo v preglednici 9.

**Preglednica 9:** Merjeni masni prehodi na kvadropolnem masnem detektorju, napetost na stožcu in kolizijska energija.

**Table 9:** The measured mass transitions and other conditions.

Analit	R <sub>t</sub> (min)	Molekulski ion (m/z)	Hčerinski ion (m/z)	Napetost na stožcu (V)	Kolizijska energija (eV)
Lasalocid	10,5	613	377	60	40
	10,5	613	595	60	30
Nigericin interni standard	11,9	747	729	50	55

### 3.1.12.3. Vrednotenje rezultatov in karakteristike metode

Koncentracije lasalocida v vzorcih smo določali z uporabo internega standarda iz umeritvene krivulje v pripadajočem matriksu. Vzoredno z vsako serijo vzorcev smo pripravili tudi umeritveno krivuljo v merjenem matriksu v različnih koncentracijskih obsegih. Za pripravo umeritvenih krivulj pri merjenju koncentracije lasalocida v jajčnikih smo uporabljali rumenjake. Vzoredno s serijo vzorcev smo pripravljali tudi vzorce za umeritvene krivulje vključno s slepim vzorcem. V ta namen smo vključili od 7 do 9 dodatnih vzorcev. Obseg umeritvenih krivulj je bil tak, da nam je omogočil merjenja lasalocida na primerljivih koncentracijskih nivojih, kot je bila vsebnost lasalocida v vzorcih. Po potrebi smo koncentracijski razpon na umeritvenih krivuljah tudi ožili.

V preglednici 10 podajamo nekaj primerov umeritvenih krivulj v različnih matriksih z doseženimi korelacijskimi koeficienti. V preglednici 11 pa podajamo dosežene LOD in LOQ za posamezna tkiva.

**Preglednica 10:** Primeri umeritvenih krivulj v različnih tkivih s korelacijskimi koeficienti

**Table 10:** Examples of calibration curves in different tissues with correlation coefficients.

Tkiva	Koncentracijski razpon $\mu\text{g}/\text{kg}$	Korelacijski koeficient $R^2$
Rumenjaki, jajčni folikli	1 – 100	0,9993
	5 – 100	0,9987; 0,9996
	1 – 150	0,9981
	1 – 300	0,9948
	1 – 500	0,9999; 0,9997
	5 – 500	0,9972
	10 – 300	0,9870; 0,9932; 0,9856
	10 – 450	0,9943
	10 – 500	0,9996; 0,9865
	10 – 600	0,9997
	25 – 450	0,9604
	25 – 300	0,9728; 0,9901
	50 – 600	0,9995
	100 – 600	0,9815
	150 – 600	0,9865
	500 – 1500	0,9938; 0,9989
500 – 2000	0,9947	
Beljaki	0 – 10	0,9999
	0,5 – 5	0,9999
	1 – 20	0,9958
Ledvice	5 – 100	0,9863; 0,9815
Meso	1 – 5	1,000
Jetra	1 – 100	0,9986
	1 – 200	0,9820
	10 – 150	0,9285; 0,9883
	10 – 600	0,9798
	100 – 500	0,9999
Koža z maščobo	1 – 100	0,9633
	1 – 150	0,9896
	50 – 200	0,9519
Abdominalna maščoba	1 – 200	0,9947

**Preglednica 11:** Meja zaznavnosti (LOD) in meja vrednotenja (LOQ) za analizirana tkiva.

**Table 11:** The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) for the analyzed tissues

<b>Tkivo</b>	<b>LOD</b> <b>µg /kg</b>	<b>LOQ</b> <b>µg/kg</b>
Rumenjaki, jajčniki	5	10
Beljaki	0,5	1
Jetra	5	10
Ledvice	1	5
Meso	1	5
Abdominalna maščoba	1	5
Koža z maščobo	1	5

### 3.1.13 Določanje lasalocida v iztrebkih

Lasalocid v iztrebkih smo določali po navodilih Standardnega operativnega postopka Univerze v Ljubljani, Veterinarske fakultete, ki predpisuje način analitskega postopka za določanje lasalocida in monensina v vzorcih iztrebkov (Zidar in Virant Celestina, 2008).

#### 3.1.13.1. Ekstrakcija in čiščenje vzorcev

Odtehtali smo po 2,5 g homogeniziranega vzorca iztrebkov ter ekstrahirali lasalocid v 10 ml izooktan-etilacetat (9+1, v/v). Po temeljitem stresanju (stresalnik 20 minut in ultrazvok 5 minut) smo vzorec centrifugirali 5 minut pri 3000 obratih. Dobljeni bistri ekstrakt smo oddekantirali in ekstrakcijo ponovili. Združena ekstrakta smo čistili na silikagelski koloni, ki smo jo predhodno aktivirali z izooktanom. Sledilo je spiranje kolone z 10 ml diklorometana. Iz posušene kolone smo eluirali lasalocid s 5 ml diklorometana-metanola (9+1, v/v). Pod tokom dušika smo dobljeni eluat osušili in ostanek raztopili v 1 ml metanola.

#### 3.1.13.2. Pogoji tekočinske kromatografije s fluorescenčno detekcijo

Za meritve lasalocida v iztrebkih smo uporabljali izokratsko kromatografijo, mobilna faza je bila sestavljena iz 0,01 mol/l acetatnega pufra pH 4,0 in metanola z volumskim razmerjem 15:85. Analitska kolona Phenomenex Luna C18 (15 x 4.60 mm ID) 5 µm delci in predkolona C18 4.0 L x 3.0 ID mm sta bili na 35° C, pretok mobilne faze pa je bil 1,0 ml/min. Injicirali

smo po 50 µl vzorca. Ekscitacijska valovna dolžina na fluorescenčnem detektorju je bila 300 nm, emisijska pa 420 nm.

### 3.1.13.3. Karakteristike metode

Meja vrednotenja (LOQ) uporabljene metode je bila 2,5 µg/kg. Linearnost umeritvene krivulje standardnih raztopin je bila dosežena v območju od 10 do 5000 ng/ml, umeritvena krivulja dobljena z dodajanjem standardov v iztrebke pa od 50 do 1000 µg/kg. Izkoristek ekstrakcije je bil 80 %, ponovljivost in obnovljivost pa sta bili < 10 %.

## 3.2 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Za vse spremenljivke (parametre) smo s Shapiro-Wilk testom najprej preverili, ali se porazdeljujejo normalno. Ker smo pri večini parametrov ugotovili, da se ne porazdeljujejo normalno, in ker smo analizirali manjše vzorce, smo v celotni analizi uporabili neparametrične teste. Neparametrični Mann-Whitney in Kruskal-Wallis test sta, kot poudarja Rice (2006), širše uporabna kot parametrični t-test oz. F-test, zato Rice predlaga rabo neparametričnega testa predvsem v primeru, ko analiziramo manjše vzorce in kadar imamo v podatkih izstopajoče vrednosti (angl. Outlierji). Neparametrični test namreč temelji na rangih, kar posledično pomeni, da izstopajoče vrednosti na izračune nimajo tako velikega vpliva, kot bi jih imeli, če bi uporabili parametrični test.

Rezultate neparametričnih testov smo primerjali z rezultati ekvivalentnih parametričnih testov in le-ti so običajno zagotovili podobne rezultate; pri interpretaciji rezultatov teh testov posebej ne izpostavljamo. Se pa pri interpretaciji in prikazu podatkov poslužujemo tako povprečne vrednosti (AS) kot tudi mediane (Me). Smatramo namreč, da je povprečna vrednost za razumevanje interpretacije bolj nazorna in hitreje razumljiva od mediane, ki jo v analizi sicer navajamo, je pa natančneje v rezultatih ne interpretiramo.

Za vse parametre smo v okviru opisnih statistik izračunali povprečno vrednost (AS), standardno napako povprečja (SE), standardni odklon (SD), mediano (Me), prvi (Q<sub>1</sub>) in tretji kvartil (Q<sub>3</sub>), minimalno (Min) ter maksimalno vrednost (Max).

Spearmanov korelacijski koeficient smo uporabili za preverjanje povezanosti med dvema spremenljivkama, npr. med maso in koncentracijo lasalocida v posameznem foliklu. V tekstu

poročamo vrednost koeficienta ( $R_s$ ) in statistično značilnost (P). Rezultate smo kot statistično značilne opredelili pri  $p < 0,05$ .

Mann-Whitney test (ki je neparametrična alternativa t- testu za dva neodvisna vzorca) smo uporabili, ko smo želeli preveriti, ali obstaja statistično značilna razlika med dvema skupinama, npr. med dvema določenima dnevoma. V tekstu poročamo U statistiko in statistično značilnost (P). Rezultate smo kot statistično značilne opredelili pri  $p < 0,05$ .

Kruskal-Wallis test (ki je neparametrična alternativa testu One-Way Anova) smo uporabili, ko smo želeli preveriti, ali obstaja statistično značilna razlika med dvema ali več skupinami, npr. med posameznimi kokošmi ali posameznimi dnevi. V tekstu poročamo  $\chi^2$ -statistiko in statistično značilnost (P). Rezultate smo kot statistično značilne opredelili pri  $p < 0,05$ .

Pri analizi podatkov smo uporabili statistični program SPSS 17.0 for Windows.

## 4. REZULTATI

Rezultate naših raziskav prikazujemo v dveh ločenih vsebinskih delih.

V prvem delu prikazujemo rezultate analiziranih vzorcev tkiv, rumenjakov in jajčnih foliklov skladno s poskusi na kokoših nesnicah. Prikazali smo rezultate poskusov krmljenja kokoši nesnic s krmo, ki je vsebovala 5,7 mg/kg (poskus 1), 3,2 mg/kg (poskus 2) in 1,1 mg/kg (poskus 3) lasalocida.

Proučili smo:

- dinamiko pojavljanja, nalaganja, izločanja in izginjanja lasalocida v posameznih tkivih, s poudarkom na vzorcih rumenjaka in jajčnih foliklov;
- primerjavo med vsebnostjo lasalocida v različnih tkivih pri znani koncentraciji lasalocida v krmi;
- primerjavo med različnimi koncentracijami lasalocida v krmi ter njegovimi ostanki v tkivih;
- vrednotenje glede na vrednosti MRL za perutnino v različnih tkivih skladno z Izvedbeno uredbo Komisije št. 1277/2014 in Uredbo Komisije št. 610/2012, ki določa vrednosti MRL za neciljne živali (kokoši nesnice);
- vrednotenje glede na vrednosti MRL za jajca pri rumenjakih in jajčnih foliklih pri koncentraciji lasalocida 1,1 mg/kg krme, ker je to vrednost, ki je na podlagi Direktive 2009/8 zakonsko določena kot dovoljena prisotnost lasalocida v krmi za neciljne živali in naj ne bi povzročala ostankov zdravila v vrednostih nad MRL in s tem tveganja za zdravje ljudi;
- povezavo med količino lasalocida v krmi in ostanki v tkivih, povezavo med velikostjo jajčnega folikla in vsebnostjo ostankov lasalocida .
- preračun vsebnosti lasalocida v rumenjaku na celo jajce pri vseh poskusih.

V drugem delu smo prikazali rezultate analiz vzorcev iztrebkov kokoši s poskusov krmljenja s krmo, ki je vsebovala 5,7 mg/kg, 3,2 mg/kg in 1,1 mg/kg lasalocida, pri katerih smo prav tako proučili dinamiko pojavljanja in izginjanja zdravilne substance iz iztrebkov in nakazali morebitne vplive na okolje.

#### 4.1 POSKUS 1 (5,7 MG/KG LASALOCIDA V KRMI).

Pri poskusu krmljenja s 5,7 mg lasalocida/kg krme smo analizirali naslednje vzorce tkiv: jetra, ledvica, mišično tkivo, abdominalno maščobo, kožo z maščobo, jajčne beljake, rumenjake in jajčne folikle. Jetra, ledvica, mišično tkivo, abdominalno maščobo in kožo z maščobo smo analizirali od sedmega dne poskusa (zadnji dan krmljenja z lasalocidom) do enaindvajsetega dne poskusa, jajčne folikle sedmi dan poskusa; vzorce rumenjaka in beljaka smo analizirali vseh enaindvajset dni poskusa in tako spremljali naraščanje lasalocida v času njegove prisotnosti v krmi ter padanje po prenehanju dajanja krme z lasalocidom.

##### 4.1.1 Jetra

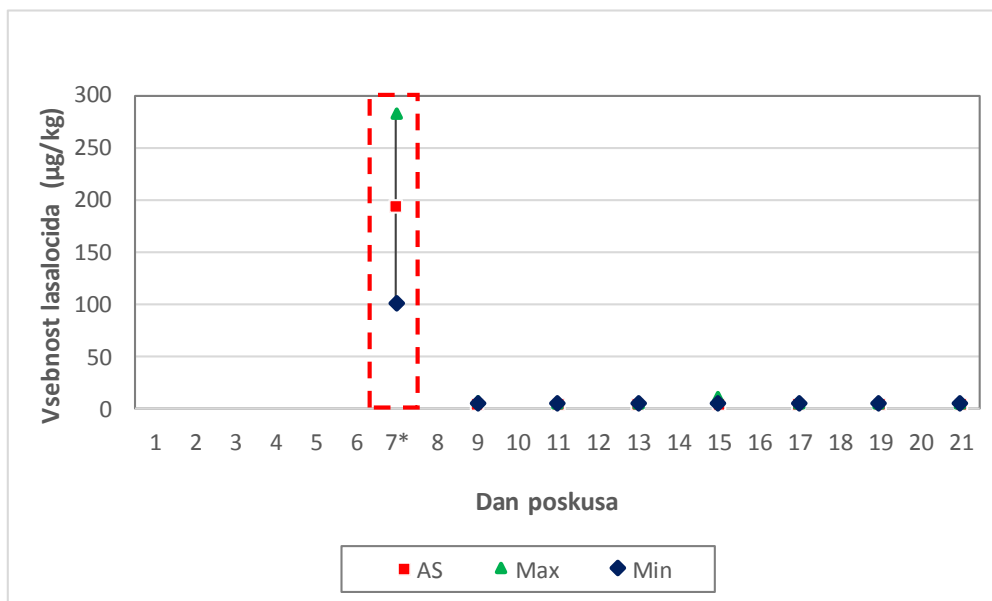
**Preglednica 12:** Vsebnost lasalocida v jetrih kokoši krmljenih s 5,7 mg lasalocida/kg krme; povprečne, najvišje in najnižje vrednosti vsebnosti lasalocida, izražene v  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

**Table 12:** Residue concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) of lasalocid in liver of laying hens, fed with lasalocid 5.7 mg / kg feed; average, maximum and minimum values.

Število vzorcev (n)	Dan poskusa							
	7*	9	11	13	15	17	19	21
1	183	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
2	250	8	< 5	< 5	11	< 5	< 5	< 5
3	233	< 5	< 5					
4	112	7	< 5					
5	101							
6	282							
n	6	4	4	2	2	2	2	2
AS	193,5	3,8	< 5	< 5	5,5	< 5	< 5	< 5
Max	282	8	< 5	< 5	11	< 5	< 5	< 5
Min	101	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5

\* zadnji dan krmljenja z lasalocidom

Iz preglednice 12 je razvidno, da smo vzorce jeter analizirali od sedmega do enaindvajsetega dne poskusa. Skupno je bilo analiziranih 24 vzorcev jeter kokoši. Pri vseh analiziranih vzorcih jeter kokoši nesnic je bila sedmi dan (zadnji dan krmljenja z lasalocidom) presežena vrednost MRL za jetra za neciljne živali ( $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). Vrednost MRL za jetra pri piščancih in puranih ( $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) pa ni bila presežena. Iz slike 12 je razvidno hitro izginjanje lasalocida iz jeter kokoši po prenehanju dajanja krme z lasalocidom ( $5,7 \text{ mg}/\text{kg}$  krme).



\*zadnji dan krmljenja z lasalocidom

**Slika 12:** Prikaz prisotnosti lasalocida v jetrih med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (5,7 mg/kg).

**Figure 12:** The presence of lasalocid in the liver of laying hens, during the treatment period and the depletion period of feeding with feed containing lasalocid (5.7 mg / kg).

#### 4.1.2 Ledvica

**Preglednica 13:** Vsebnost lasalocida v ledvicah kokoši krmljenih s 5,7 mg lasalocida/kg krme; povprečne, najvišje in najnižje vrednosti vsebnosti lasalocida izražene v µg/kg.

**Table 13:** Residue concentration (µg/kg) of lasalocid in kidney of laying hens, fed lasalocid 5.7 mg/kg feed; average, maximum and minimum values.

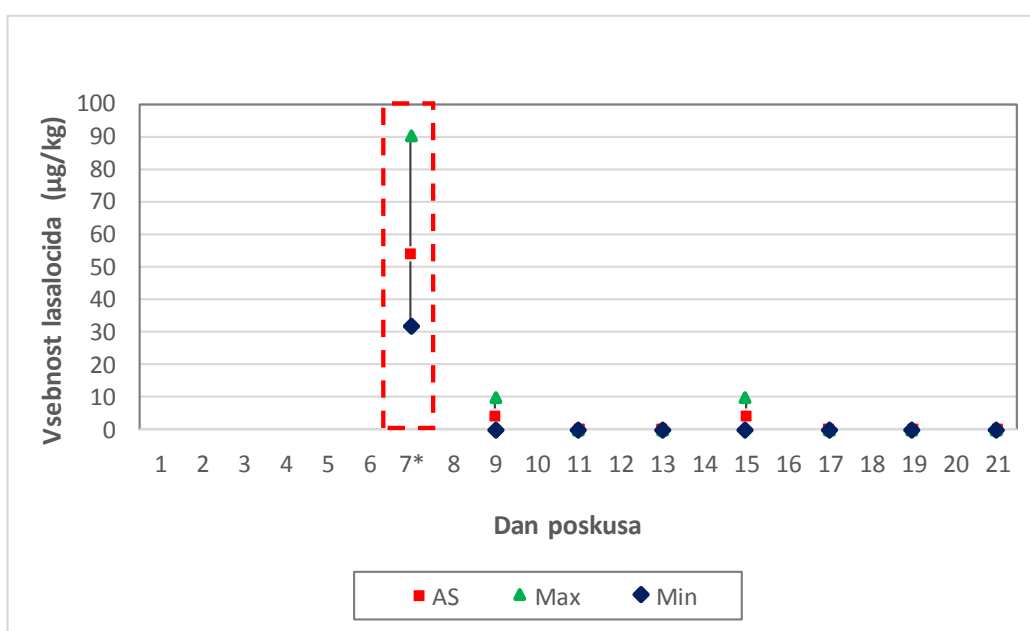
Število vzorcev (n)	Dan poskusa						
	7*	9	11	13	15	17	19
1	44	< 1	< 1	< 1	9	< 1	< 1
2	57	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
3	34	10	< 1				
4	69	7	< 1				
5	90						
6	32						
n	6	4	4	2	2	2	2
AS	54,3	4,3	< 1	< 1	4,3	< 1	< 1
Max	90	10	< 1	< 1	10	< 1	< 1
Min	32	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

\* zadnji dan krmljenja z lasalocidom



Iz preglednice 13 je razvidno, da smo skupno preiskali 22 vzorcev ledvic kokoši, analize smo opravljali od sedmega do devetnajstega dne poskusa. Dinamika preiskovanih vzorcev je bila naslednja: sedmi dan šest vzorcev, deveti in enajsti dan po štiri vzorci in trinajsti, petnajsti, sedemnajsti ter devetnajsti dan po dva vzorca. Vse ugotovljene vrednosti sedmi dan so presegle vrednosti MRL za ledvica (20 µg/kg) za neciljne živali, niso pa presegle vrednosti MRL za piščance in purane (150 µg/kg).

Iz slike 13 je razvidno hitro izginjajnje lasalocida iz ledvic kokoši po prenehanju dajanja krme z lasalocidom (5,7 mg/kg krme).



\*zadnji dan krmljenja z lasalocidom

**Slika 13:** Prikaz prisotnosti lasalocida v ledvicah v µg/kg, med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (5,7 mg/kg).

**Figure 13:** The presence of lasalocid in the kidneys in µg / kg, during the treatment period and the depletion period of feeding with feed, containing lasalocid (5.7 mg/kg).

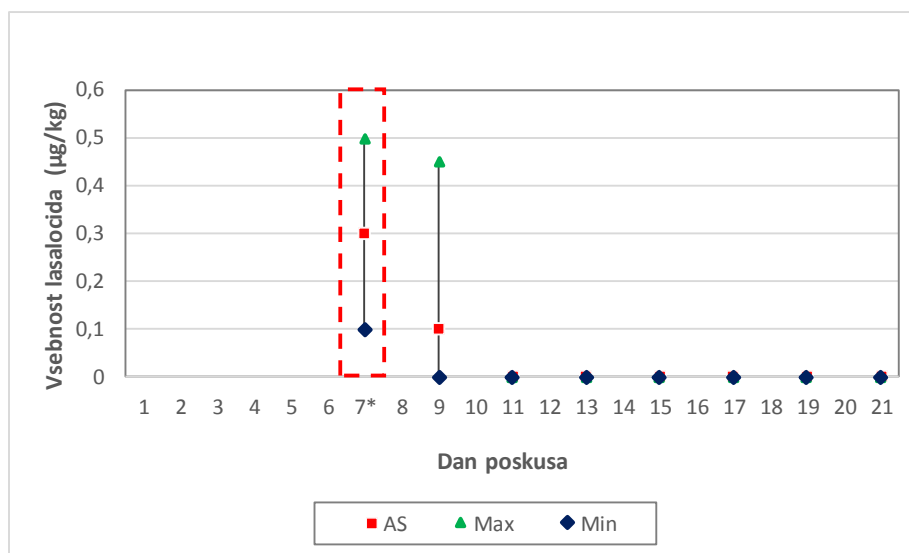
### 4.1.3 Mišično tkivo

**Preglednica 14:** Vsebnost lasalocida mišičnem tkivu kokoši krmljenih s 5,7 mg lasalocida/kg krme; povprečne, najvišje in najnižje vrednosti vsebnosti lasalocida izražene v  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

**Table 14:** Residue concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) of lasalocid in muscle tissue of laying hens ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), fed with 5.7 mg of lasalocid/kg feed; average, maximum and minimum values.

Število vzorcev (n)	Dan poskusa							
	7*	9	11	13	15	17	19	21
1	0,2	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
2	0,2	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
3	0,2	< 1	< 1					
4	0,3	0,45	< 1					
5	0,5							
6	0,1							
n	6	4	4	2	2	2	2	2
AS	0,3	0,1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Max	0,5	0,45	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Min	0,1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

\* zadnji dan krmljenja z lasalocidom



\*zadnji dan krmljenja z lasalocidom

**Slika 14:** Prikaz prisotnosti lasalocida v mišičnem tkivu v  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (5,7 mg/kg).

**Figure 14:** The presence of lasalocid ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) in muscle tissue of laying hens, during the treatment period and the depletion period of feeding with feed, containing lasalocid (5.7 mg/kg).

Analize mišičnega tkiva kokoši smo opravili sedmi dan, to je zadnji dan dajanja krme z lasalocidom (šest vzorcev), deveti in enajsti dan (štirje vzorci) ter trinajsti, petnajsti, sedemnajsti, devetnajsti in enaindvajseti dan po dva vzorca. Skupno smo analizirali 24 vzorcev mišičnega tkiva kokoši nesnic. Lasalocid smo ugotovili sedmi dan poskusa pri vseh analiziranih vzorcih, vrednosti so bile med 0,1 µg/kg in 0,5 µg/kg. Pri enem vzorcu smo lasalocid ugotovili še deveti dan, to je dva dni po prenehanju dajanja (0,45 µg/kg), medtem ko kasneje ni bil več ugotovljen (preglednica in slika 14).

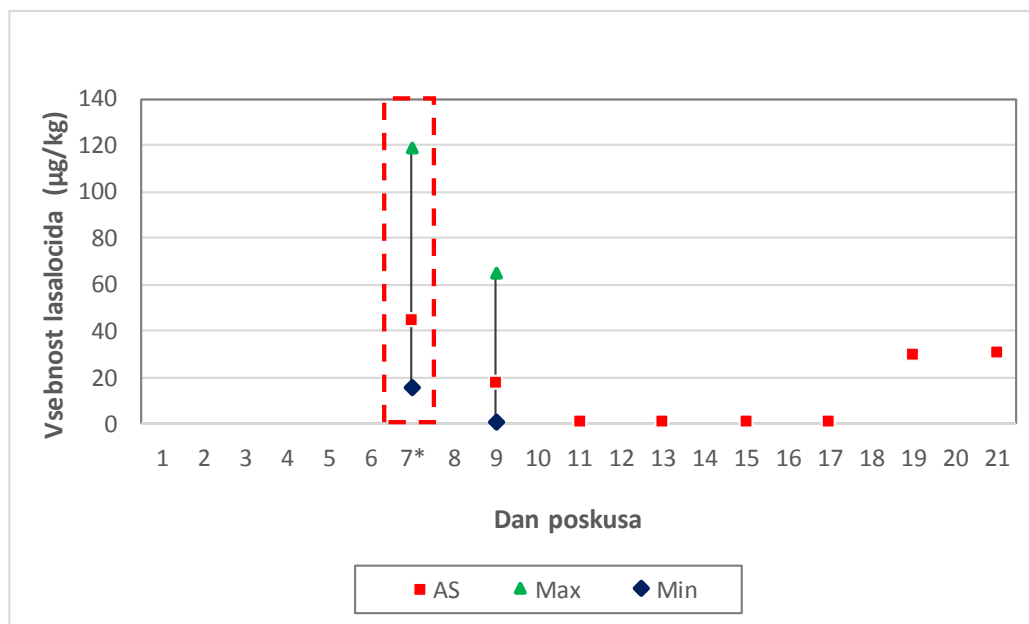
#### 4.1.4 Abdominalna maščoba

**Preglednica 15:** Vsebnost lasalocida v abdominalni maščobi kokoši krmljenih s 5,7 mg lasalocida/kg krme; povprečne, najvišje in najnižje vrednosti vsebnosti lasalocida izražene v µg/kg.

**Table 15:** Residue concentration (µg/kg) of lasalocid in abdominal fat of laying hens, fed with 5.7 mg of lasalocid / kg feed; average, maximum and minimum values.

Število vzorcev (n)	Dan poskusa							
	7*	9	11	13	15	17	19	21
1	24	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
2	22	7	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
3	36	< 1	< 1					
4	51	65	< 1					
5	119							
6	16							
n	6	4	4	2	2	2	2	2
AS	45	18	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Max	119	65						
Min	16	< 1						

\*zadnji dan krmljenja za lasalocidom



\*zadnji dan krmljenja z lasalocidom

**Slika 15:** Prikaz prisotnosti lasalocida v maščobi kokoši med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (5,7 mg/kg).

**Figure 15:** The presence of lasalocid in abdominal fat from laying hens, during the treatment period and the depletion period of feeding with feed, containing lasalocid (5.7 mg / kg).

Skupno smo analizirali 24 vzorcev abdominalne maščobe kokoši nesnic. Analize smo opravili sedmi dan poskusa, to je zadnji dan krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (šest vzorcev), deveti dan (štiri vzorce), enajsti dan (štiri vzorce) ter trinajsti, petnajsti, sedemnajsti, devetnajsti in enaindvajseti dan (dva vzorca) poskusa (preglednica 15). Iz slike 15 je razvidna dinamika izginjanja lasalocida iz abdominalne maščobe kokoši nesnic po prenehanju dajanja krme z lasalocidom.

#### 4.1.5 Koža z maščobo

**Preglednica 16:** Vsebnost lasalocida v koži z maščobo kokoši krmljenih s 5,7 mg lasalocida/kg krme; povprečne, najvišje in najnižje vrednosti vsebnosti lasalocida izražene v µg/kg.

**Table 16:** Residue concentration (µg/kg) of lasalocid in skin with fat of laying hens, fed with lasalocid 5.7 mg / kg feed; average, maximum and minimum values.

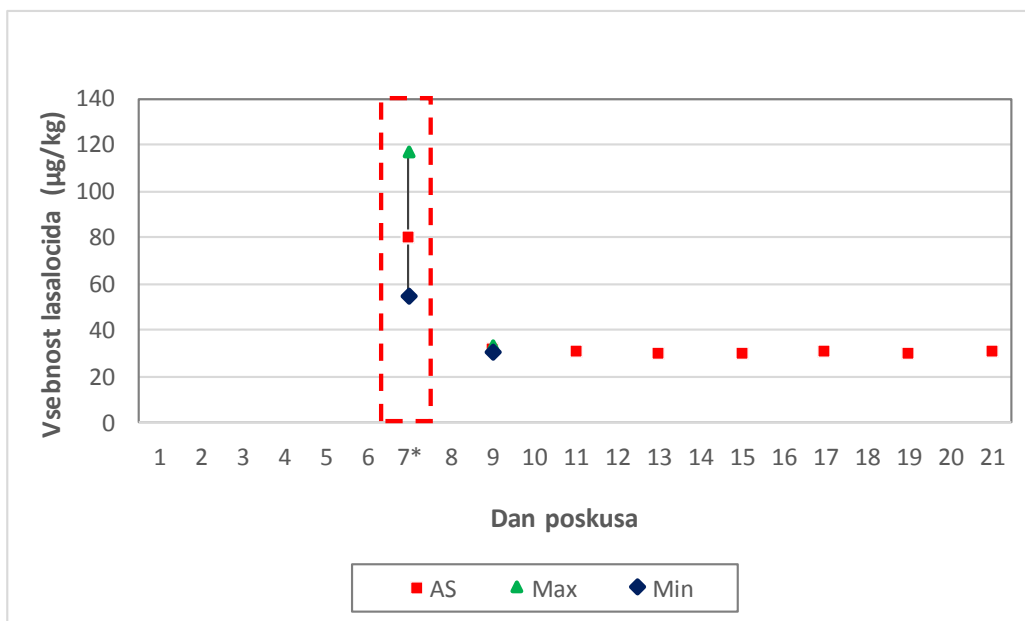
št. anal. vzorca	Dan poskusa							
	7*	9	11	13	15	17	19	21
1	88	31						
2	85	31						
3	64	31						
4	69	33						
5	117							
6	55							
n	6	4	4	2	2	2	2	2
AS	80	32	31	30	30	31	30	31
Max	117	33						
Min	55	31						

\*zadnji dan krmljenja z lasalocidom

Iz preglednice 16 je razvidno, da smo vzorce kože z maščobo kokoši nesnic analizirali od sedmega dne (zadnji dan krmljenja z lasalocidom) do enaindvajsetega dne poskusa. Skupno smo analizirali 24 vzorcev kože z maščobo. Analize smo v času trajanja poskusa opravili po naslednji dinamiki: sedmi dan šest vzorcev, deveti dan štiri vzorci, enajsti dan štiri vzorci ter trinajsti, petnajsti, sedemnajsti, devetnajsti in enaindvajseti dan po dva vzorca.

Pri analizah vzorcev na 11., 13., 15., 17., 19. in 21. dan smo najprej pripravili skupen »dnevni« vzorec in jih potem analizirali, tako da podajamo le srednjo vrednost.

Iz slike 16 je razvidno izginjanje lasalocida iz kože z maščobo kokoši nesnic, po prenehanju dajanja krme z lasalocidom.



\*zadnji dan krmljenja z lasalocidom

**Slika 16:** Prikaz prisotnosti lasalocida v koži z maščobo med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (5,7 mg/kg).

**Figure 16:** The presence of lasalocid in skin with fat, during the treatment period and the depletion period of feeding with feed, containing lasalocid (5.7 mg/kg).

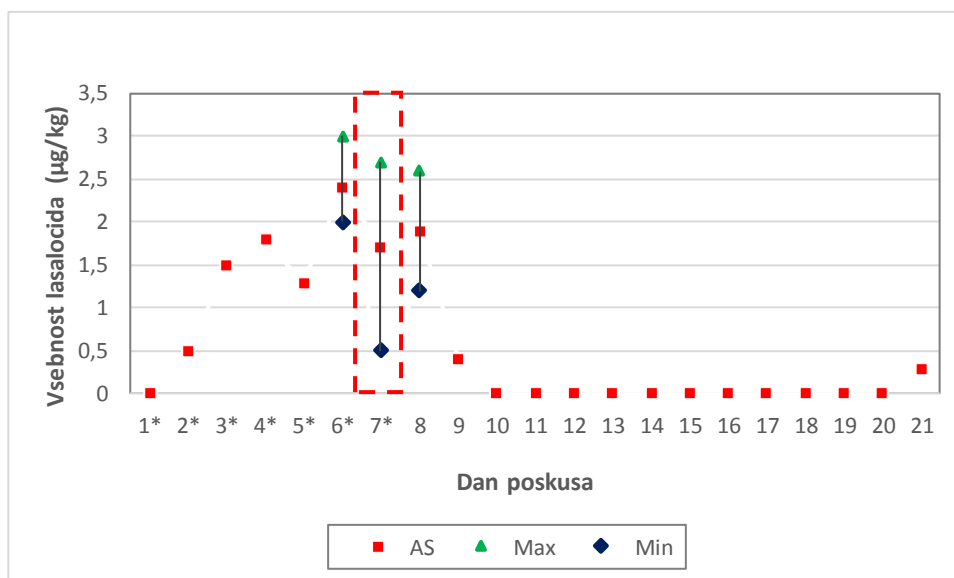
#### 4.1.6 Jajčni beljak

**Preglednica 17:** Vsebnost lasalocida v jajčnem beljaku kokoši krmljenih s 5,7 mg lasalocida/kg krme; povprečne najvišje in najnižje vrednosti vsebnosti lasalocida izražene v µg/kg.

**Table 17:** Residue concentration (µg/kg) of lasalocid in egg white of laying hens, fed with lasalocid 5.7 mg/kg feed; average, maximum and minimum values.

št. vzorcev	Dan poskusa																				
	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1						2	2,7	1,2													
2						2,6	0,7	1,6													
3						2,1	2,4	2,1													
4						3	2,4	2,1													
5							0,5	2,6													
6							1,2	1,9													
n	6	6	6	6	6	4	6	6	6	6	6	6	6	6	5	5	5	4	2	1	4
AS	0,0	0,5	1,5	1,8	1,3	2,4	1,7	1,9	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3
Max						3	2,7	2,6													
Min						2	0,5	1,2													

\*dnevi krmljenja z lasalocidom



\*dnevi krmljenja z lasalocidom

**Slika 17:** Prikaz prisotnosti lasalocida v beljakah med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (5,7 mg/kg).

**Figure 17:** The presence of lasalocid (µg/kg) in the egg white, during the treatment period and the depletion period of feeding with feed, containing lasalocid (5.7 mg/kg).

Analize beljaka smo opravljali od prvega do enaindvajsetega (zadnjega) dne poskusa. Šesti, sedmi in osmi dan poskusa smo analizirali posamezne vzorce beljaka, vse ostale dni smo analizirali skupni vzorec, zato podajamo povprečne vrednosti analiziranih vzorcev beljaka (preglednica 17). Na sliki 17 prikazujemo dinamiko pojavljanja in izginjanja lasalocida iz jajčnega beljaka, med in po prenehanju dajanja krme, ki je vsebovala lasalocid.

### 4.1.7 Rumenjaki

**Preglednica 18:** Vsebnost lasalocida v jajčnem rumenjaku kokoši krmljenih s 5,7 mg lasalocida/kg krme; povprečne najvišje in najnižje vrednosti vsebnosti lasalocida izražene v µg/kg.

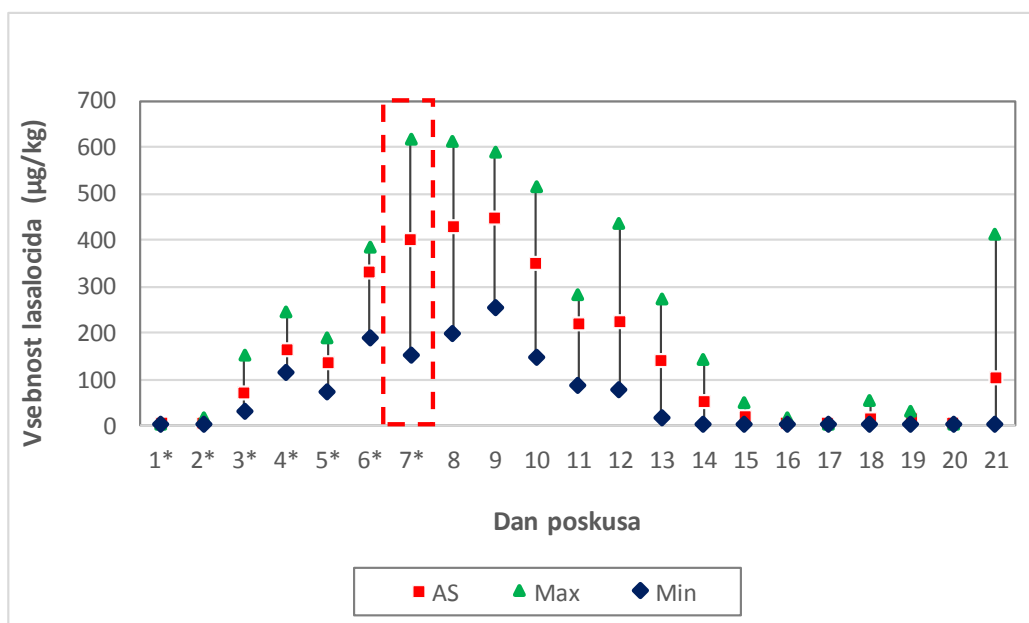
**Table 18:** Residue concentration (µg/kg) of lasalocid in egg yolk of hens, fed with 5.7 mg of lasalocid/kg feed; average maximum and minimum values.

št. anal. rumenjaka	Dan poskusa																					
	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	<5	8	151	155	76	188	523	209	368	463	90	80	160	21	4	5	<5	57	32	<5	413	
2	<5	18	61	244	182	385	233	614	592	389	235	188	167	49	<5	4	<5	<5	<5		<5	
3	<5	12	58	149	106	377	590	527	415	515	263	198	142	142	17	<5	<5	<5			<5	
4	<5	<5	34	197	192	353	153	535	254	258	255	439	273	71	16	18	<5	<5			<5	
5	<5	<5	72	138	187	357	294	198	575	340	283	158	16	20	52	<5	<5					
6	<5	<5	67	115	83	332	617	488	491	148	194	293	96	<5								
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	5	5	5	4	2	1	4
AS	<5	6,3	73,8	166,3	137,7	332,0	401,7	428,5	449,2	352,2	220,0	226,0	142,3	51,0	18,2	6,0	<5	14,8	16,0	<5	103,3	
Max	<5	18	151	244	192	385	617	614	592	515	283	439	273	142	52	18	<5	57	32	<5	413	
Min	<5	<5	34	115	76	188	153	198	254	148	90	80	16	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	

\*dnevi krmljenja z lasalocidom

Iz preglednice 18 je razvidno, da smo skupno analizirali 110 vzorcev jajčnih rumenjakov. Analize smo izvajali vseh enaindvajset dni trajanja poskusa. Dinamika opravljanja analiz vzorcev je bila: prvi do štirinajsti dan poskusa po šest vzorcev, petnajsti do sedemnajsti dan pet vzorcev, osemnajsti dan štirje vzorci, devetnajsti dan dva vzorca, dvajseti dan en vzorec in enaindvajseti dan štirje vzorci rumenjakov. Na sliki 18 prikazujemo dinamiko nalaganja in izginjanja lasalocida iz jajčnega rumenjaka, med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid.





\*dnevi krmljenja z lasalocidom (1–7).

**Slika 18:** Prikaz prisotnosti lasalocida v jajčnem rumenjaku v µg/kg, med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (5,7 mg/kg).

**Figure 18:** The presence of lasalocid (µg/kg) in the egg yolks, during the treatment period and the depletion period of feeding with feed, containing lasalocid (5.7 mg / kg).

V preglednici 19 predstavljamo osnovne statistične podatke (povprečno vrednost, standardni odklon, standardno napako, srednjo vredno, kvartilni razmik ter najnižjo in najvišjo vrednost) analiziranih jajčnih rumenjakov po dnevih poskusa pri krmljenju kokoši nesnic s krmo, ki je vsebovala 5,7 mg lasalocida/kg krme. Na sliki 19 predstavljamo pojavljanje in izginjanje (povprečna, najvišja, najnižja vrednost ter mediana) lasalocida v jajčnih rumenjakih kokoši med in po prenehanju dajanja krme, ki je vsebovala lasalocidom (5,7 mg/kg).

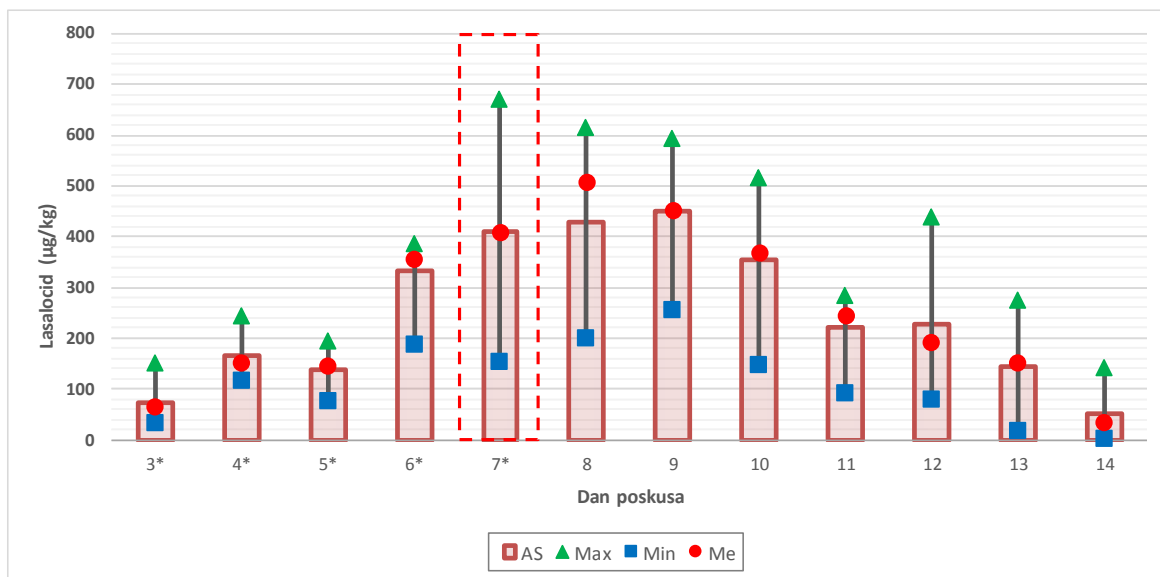
**Preglednica 19:** Poskus krmljenja kokoši nesnic s 5,7 mg lasalocida/kg krme; povprečna vrednost (AS), standardni odklon (SD), standardna napaka (SE), mediana (Me), kvartilni razmik (Q3–Q1), najnižja (Min), najvišja (Max) vrednost in število analiziranih rumenjakov po dnevih poskusa (N).

**Table 19:** Experimental feeding laying hens with 5.7 mg of lasalocid / kg feed; the average value (AS), standard deviation (SD), standard error (SE), median (Me), interquartile range (Q3–Q1) and lowest (Min), maximum (Max) value and the number of egg yolks, analyzed by day of the experiment (N).

Dnevi poskusa	N	AS	SD	SE	Me	Q3-Q1	Min	Max
3*	6	73,83	40,02	16,34	64,00	91,75–52,00	34,00	151,00
4*	6	166,33	46,56	19,01	152,00	208,75–32,25	115,00	244,00
5*	6	137,67	55,04	22,47	144,00	188,25–81,25	76,00	192,00
6*	6	332,00	72,99	29,79	355,00	379,00–296,00	188,00	385,00
7*	6	410,67	211,72	86,43	408,50	610,25–213,00	153,00	671,00
8	6	428,50	179,06	73,09	507,50	554,75–206,25	198,00	614,00
9	6	449,16	129,48	52,86	453,00	579,25–339,50	254,00	592,00
10	6	353,66	135,34	55,25	369,00	476,00–230,00	148,00	515,00
11	6	220,00	70,49	28,78	245,00	268,00–168,00	90,00	283,00
12	6	226,00	124,92	50,99	193,00	329,50–138,50	80,00	439,00
13	6	142,33	84,97	34,69	151,00	193,50–76,00	16,00	273,00
14	6	51,00	50,69	20,70	35,00	88,75–15,75	3,00	142,00
Skupaj	72	249,26	171,20	20,18	197,33	365,25–120,75	3,00	671,00

\* dnevi krmljenja z lasalocidom

Opomba: V statistično analizo podatkov smo zajeli podatke od tretjega do štirinajstega dne, ker je bilo v ostalih dneh premalo podatkov.



\*dnevi krmljenja z lasalocidom

**Slika 19:** Prikaz prisotnosti lasalocida v jajčnih rumenjakih jajc kokoši; povprečje, najvišje in najnižje vrednosti ter mediana, izražene v µg/kg, med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (5,7 mg/kg).

**Figure 19:** The presence of lasalocid in the egg yolks of hens; the average value, maximum, minimum values and the median, expressed in µg/kg, during the treatment period and the depletion period of feeding with feed, containing lasalocid (5.7 mg/kg).

S Kruskal-Wallis H testom smo dokazali, da obstaja statistično značilna razlika v vsebnosti lasalocida v jajčnem rumenjaku po posameznih dnevih ( $\chi^2(11) = 49,097$ ,  $p = 0,000$ ). Med katerimi dnevi obstaja statistično značilna razlika, smo preverili z Mann-Whitney testom. Ugotovili smo, da se vrednosti po dnevih med seboj večinoma statistično značilno razlikujejo, kar prikazujemo v preglednici 20.

**Preglednica 20:** Vrednosti Mann-Whitney U-testa za rumenjake kokoši nesnic, krmljenih s krmo, ki je vsebovala lasalocid (5,7 mg/kg), v primerih ko med dnevi obstaja statistično značilna razlika.

**Table 20:** The values of the Mann-Whitney U-test for egg yolks of laying hens, fed with feed containing lasalocid (5.7 mg/kg), in cases when there is a statistically significant difference within the days.

*Dan <sup>1</sup>	*Dan <sup>2</sup>	U	P	Dan <sup>1</sup>	Dan <sup>2</sup>	U	P
3	4	3,000	0,016	6	11	5,000	0,037
3	5	3,000	0,016	6	13	1,000	0,006
3	6	0,000	0,004	6	14	0,000	0,004
3	7	0,000	0,004	7	13	4,000	0,025
3	8	0,000	0,004	7	14	0,000	0,004
3	9	0,000	0,004	8	12	4,500	0,030
3	10	1,000	0,006	8	13	2,000	0,010
3	11	1,000	0,006	8	14	0,000	0,004
3	12	1,000	0,006	9	11	3,000	0,016
3	13	8,000	0,109	9	12	4,000	0,025
			0,200	9	13	1,000	0,006
			0,010	9	14	0,000	0,004
4	7	4,000	0,025	10	13	4,000	0,025
4	8	2,000	0,010	11	14	1,000	0,006
4	9	0,000	0,004	12	14	1,000	0,006
4	10	4,000	0,025				
4	14	2,000	0,010				
5	6	1,000	0,006				
5	7	3,000	0,016				
5	8	0,000	0,004				
5	9	0,000	0,004				
5	10	3,000	0,016				
5	11	4,000	0,025				
5	14	3,000	0,016				

\*Legenda: Med seboj primerjamo dan<sup>1</sup> in dan<sup>2</sup>

Najbolj izstopa tretji dan, ko je vsebnost lasalocida še zelo nizka (AS=73,83; Me=64,00) in se statistično značilno razlikuje od vsebnosti lasalocida vse do oz. vključno z dvanajstim dnem. Trinajsti dan pa je vrednost zopet tako nizka (AS=51,00; Me=35,00), da ni statistično značilne razlike v vsebnosti lasalocida med tretjim in trinajstim dnem. Ugotovili smo, da načeloma med zaporednimi dnevi (npr. med tretjim in četrtem) ni statistično značilnih razlik, beležimo pa statistično značilne razlike med ključnimi mejniki opazovanja, npr. med tretjim in sedmim dnem (U = 0,000; P = 0,004; AS (3) = 73,8333, Me (3)=64,00 , AS (7) = 410,66, Me (7) = 408,50); med petim in šestim dnem (U = 1,000; P = 0,006; AS (5) = 137,66, Me (5) = 144,00, AS (6) = 332,00, Me (6) = 355,00); med sedmim in štirinajstim dnem (U = 0,000, P = 0,004; AS (7) = 410,66, Me (7) = 408,50, AS (14) = 51, Me (14) = 35,00).

#### **4.1.8 Jajčni folikli**

Vzorci za analize smo odvzeli sedmi dan poskusa (zadnji dan krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid) in enaindvajseti dan (zadnji dan poskusa). Sedmi dan smo od šestih žrtvovanih kokoši analizirali dvainosemdeset vzorcev foliklov; enaindvajseti dan smo od dveh žrtvovanih kokoši analizirali enaindvajset foliklov. Število analiziranih foliklov ter njihove vrednost po posamezni kokoši sedmi dan, so prikazane v preglednici 21. Enaindvajseti dan (zadnji dan poskusa) smo skupno analizirali 21 foliklov, povprečna masa foliklov je bila 2,95 gramov, vsebnost lasalocida v foliklih pa je bila  $<10 \mu\text{g/kg}$ .

Pri statistični obdelavi podatkov smo primerjali maso foliklov s koncentracijo lasalocida pri posamezni kokoši in med vsemi šestimi kokošmi v poskusu sedmi dan poskusa, to je zadnji dan krmljenja z lasalocidom.

Osnovni statistični podatki vseh analiziranih foliklov so prikazani v preglednici 22.

**Preglednica 21:** Poskus krmljenja kokoši s 5,7 mg lasalocida/kg krme; število analiziranih foliklov po kokoših sedmi dan poskusa, masa folikla v gramih, vsebnost lasalocida v ng/gram folikla in masa lasalocida na folikel v ng/g.

**Table 21:** Experimental feeding of laying hens with 5.7 mg of lasalocid/kg feed; number of follicles analyzed on the seventh day of the experiment, the follicle mass (g), the amount of lasalocid in the follicle (ng/g) and lasalocid mass in regard to follicle (ng/g).

dan odvzema	št. anal. kokoši	folikel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
7. dan	1	masa (g)	7,506	13,919	6,531	2,552	0,694	0,263	0,236	0,295	0,151	0,174	0,143	0,133	0,125	0,122	0,11	0,125	0,086	0,166
		ng LA/g	854	848	852	1377	1245	909	1143	1010	1152	1049	930	1037	667	1193	1287	859	888	1160
		ng LA/folikel	6410	11803	5564	3514	864	239	270	298	174	183	133	138	83	146	142	107	76	193
	2	masa (g)	12,642	9,342	0,383	0,192	0,305	0,312	0,142	0,166	0,13	0,15	0,139	0,083	0,072	0,068	0,043	0,05		
		ng LA/g	766	715	1481	737	694	879	545	569	740	667	579	3238	779	679	663	844		
		ng LA/folikel	9684	6680	567	142	212	274	77	94	96	100	80	269	56	46	29	42		
	3	masa (g)	0,442	0,159	0,177	0,137	0,139	0,126	0,103											
		ng LA/g	1582	1224	658	823	431	833	547											
		ng LA/folikel	699	195	116	113	60	105	56											
	4	masa (g)	12,094	6,091	3,217	0,416	0,289	0,364	0,221	0,176	0,136	0,089	0,074	0,074	0,08	0,065	0,065	0,052		
		ng LA/g	889	781	916	975	647	1218	1234	736	1551	887	883	930	946	1161	1040	1304		
		ng LA/folikel	10751,6	4757,0	2946,8	405,6	186,983	443,352	274,703	129,536	210,936	78,943	61,642	68,82	75,68	75,465	67,6	67,808		
	5	masa (g)	8,141	6,037	3,683	0,49	0,406	0,178	0,187	0,185	0,143	0,101	0,126	0,048	0,072	0,048				
		ng LA/g	2018	1994	2007	2042	2004	1328	1203	1440	1747	1929	1841	2497	2227	2176				
		ng LA/folikel	16429	12038	7392	1001	814	236	225	266	250	195	232	120	160	104				
	6	masa (g)	14,73	6,689	3,238	0,403	0,086	0,082	0,091	0,052	0,087	0,083	0,064							
		ng LA/g	1102	1058	1317	967	1035	1050	1436	1641	1062	1811	915							
		ng LA/folikel	16232,5	7076,96	4264	390	89	86	131	85	92	150	59							

**Preglednica 22:** Povprečna vrednost (AS), standardni odklon (SD), mediana (Me), kvartilni razmik (Q3–Q1) analiziranih foliklov kokoši ter povezanost med maso folikla in koncentracijo lasalocida v foliklih ( $R_s$ ) sedmi dan krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (5,7 mg/kg).

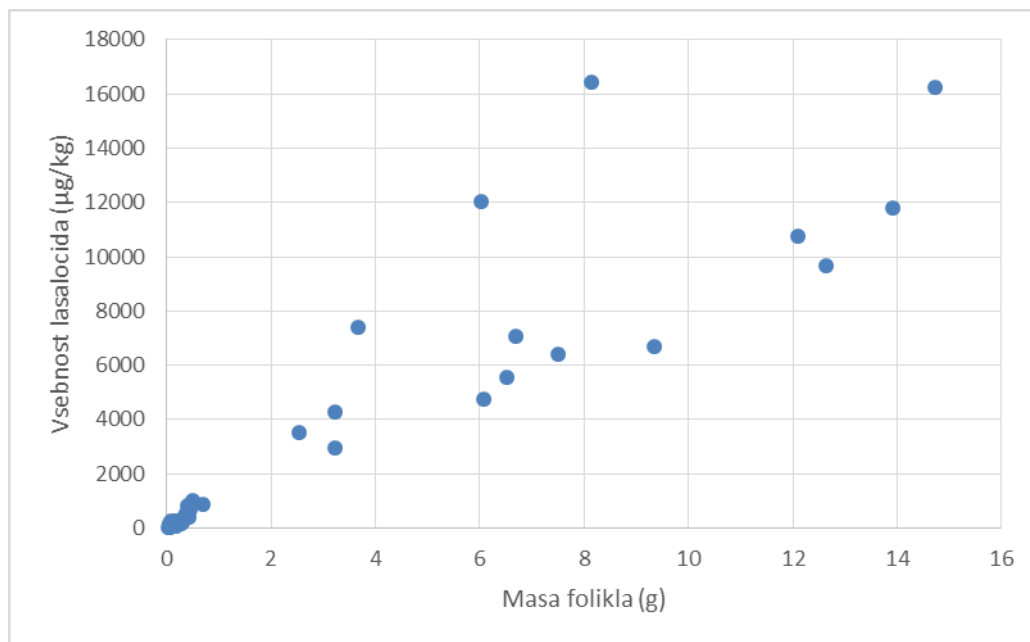
**Table 22:** The average value (AS), standard deviation (SD), median (Me), interquartile range (Q3–Q1) for the analyzed follicles and the relation between the mass of the follicle and the concentration of lasalocid in follicles ( $R_s$ ), on the seventh day of feeding the feed, containing lasalocid (5.7 mg/kg).

		Masa folikla (g)		Koncentracija lasalocida/folikel ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		Spearmanov korelacijski koeficient
Kokoš	N	AS (SD)	Me (Q3-Q1)	AS (SD)	Me (Q3-Q1)	$R_s$
1	18	1,85 (3,75)	0,17 (1,16-0,13)	1685,38 (3196,91)	188,00 (1526,50-136,75)	0,944**
2	16	1,51 (3,75)	0,15 (0,31-0,05)	1153,00 (2801,36)	98,00 (272,75-61,25)	0,891**
3	7	0,18 (0,12)	0,14 (0,17-0,13)	192,00 (228,24)	113,00 (195,00-60, 00)	0,857*
4	16	1,47 (3,26)	0,16 ( 0,40-0,07)	1287,65 (2839,59)	158,26 (433,91-70,48)	0,948**
5	14	1,42 (2,61)	0,18 ( 1,29-0,09)	2818,71 (5264,41)	243,00 (2598,75-186,25)	0,950**
6	11	2,34 (4,61)	0,09 (3,24-0,08)	2605,04 (5072,83)	131 (4264,00-86,00)	0,936**
<b>Skupaj</b>	<b>82</b>	<b>1,56</b> <b>(3,42)</b>	<b>0,15</b> <b>( 0,40-0,08)</b>	<b>1693,28</b> <b>(3652,00)</b>	<b>175,50</b> <b>( 474,26-88,25)</b>	<b>0,885**</b>

\*Povezanost je statistično značilna pri 5-odstotni stopnji značilnosti ( $p < 0,05$ ).

\*\*Povezanost je statistično značilna pri 1-odstotni stopnji značilnosti ( $p < 0,01$ ).

Povezanost med maso folikla in koncentracijo lasalocida v posameznem foliklu smo preverjali s Spearmanovim korelacijskim koeficientom na celotnem vzorcu vseh šestih kokoši in po posameznih kokoših zadnji (sedmi) dan dajanja krme z lasalocidom (preglednica 22). S statistično obdelavo rezultatov smo dokazali, da obstaja statistično značilna pozitivna povezanost med obema spremenljivkama na celotnem vzorcu in po posameznih kokoših, ki je v vseh primerih visoka, saj je koeficient vedno večji od 0,8. To pomeni, da npr. večja kot je masa folikla, večja je tudi koncentracija lasalocida na folikel (slika 20).



**Slika 20:** Prikaz povezanosti med maso folikla (g) in koncentracijo lasalocida/folikel ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), sedmi dan krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (5,7 mg/kg).

**Figure 20:** The relation between the mass of the follicle (g) and the concentration of lasalocid/follicle ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), on the seventh day of feeding with feed, containing lasalocid (5.7 mg/kg).

Z uporabo neparametričnega testa za več neodvisnih vzorcev (Kruskal–Wallis Test) smo preverili, ali obstajajo statistično značilne razlike v obeh spremenljivkah med posameznimi kokošmi. Test je pokazal, da statistično značilna razlika med kokošmi ne obstaja. Dobljeni rezultati potrjujejo tezo, da statistična značilna razlika v masi ( $\chi^2(5)=2,430$ ;  $p=0,787$ ) in v koncentraciji lasalocida ( $\chi^2(5)=10,018$ ,  $p=0,075$ ) med kokošmi ne obstaja.

Z Mann–Whitney testom pa smo preverili, če obstaja statistično značilna razlika med posameznimi kokošmi in ugotovili, da razlika ne obstaja, vse kokoši so se obnašale približno enako, odstopanja smo ugotovili samo pri peti kokoši. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko pričakujemo, da se bodo pri koncentraciji lasalocida v krmi (5,7mg/kg) v foliklih pojavljale vsebnosti, ki smo jih ugotovili z našimi poskusi.



## 4.2 POSKUS 2 (3,2 MG/KG LASALOCIDA V KRMI).

Pri poskusu krmljenja s 3,2 mg lasalocida/kg krme smo analizirali naslednje vzorce tkiv: jetra, ledvice, kožo z maščobo, rumenjake in jajčne folikle. Jajčne folikle smo analizirali sedmi dan (zadnji dan krmljenja z lasalocidom) in enaindvajseti dan (zadnji dan poskusa). Jetra, ledvice, kožo z maščobo in rumenjake smo analizirali od prvega do dvanajstega dne poskusa, z namenom podrobnega spremljanja dinamike nalaganja lasalocida v posameznih tkivih v času krmljenja in dinamiko njegovega padanja v času dajanja krme brez lasalocida. Zaradi predhodno ugotovljenih nizkih vsebnosti lasalocida (v poskusu 1) v vzorcih abdominalne maščobe, mišičnega tkiva in jajčnega beljaka teh vzorcev nismo več analizirali.

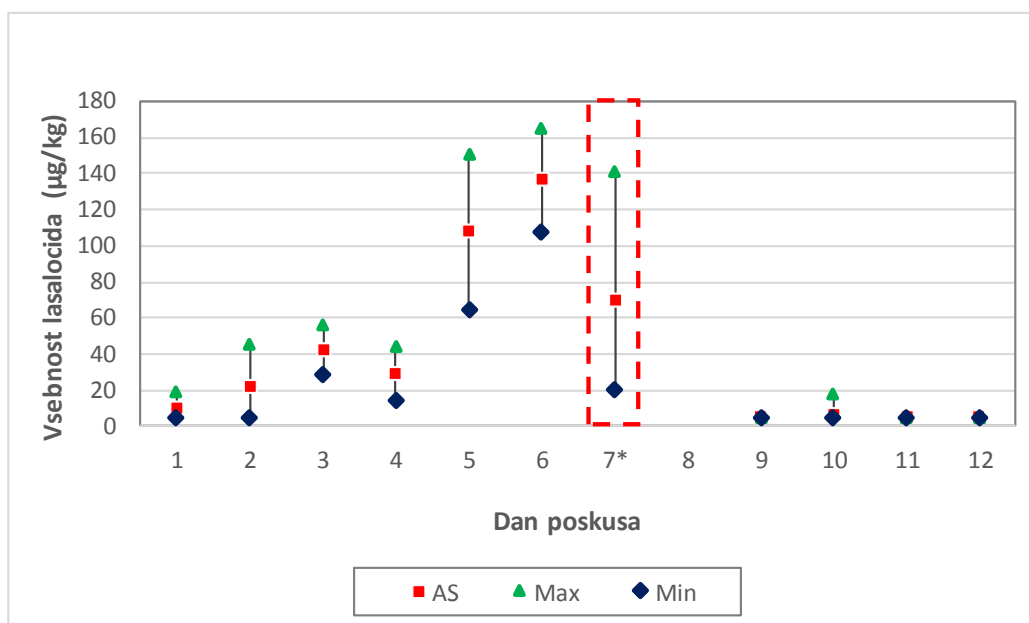
### 4.2.1 Jetra

**Preglednica 23:** Vsebnost lasalocida v jetrih kokoši krmljenih s 3,2 mg lasalocida/kg krme; povprečne, najvišje in najnižje vrednosti vsebnosti lasalocida izražene v  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

**Table 23:** The presence of lasalocid in the liver of hens ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), fed with lasalocid 3.2 mg/kg feed; average, maximum and minimum values.

št. anal. vzorca	Dan poskusa										
	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	9	10	11	12
1	19	< 5	28	44	151	165	141	< 5	< 5	< 5	< 5
2	< 5	45	56	14	65	108	50	< 5	< 5	< 5	< 5
3							36	< 5	18		
4							127				
5							20				
6							47				
n	2	2	2	2	2	2	6	3	3	2	2
AS	9,5	22,5	42,0	29,0	108,0	136,5	70,2	< 5	6,0	< 5	< 5
Max	19	45	56	44	151	165	141	< 5	18	< 5	< 5
Min	< 5	< 5	28	14	65	108	20	< 5	< 5	< 5	< 5

\*dnevi krmljenja z lasalocidom



\*zadnji dan krmljenja z lasalocidom

**Slika 21:** Prikaz prisotnosti lasalocida v jetrih med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (3,2 mg/kg).

**Figure 21:** The presence of lasalocid in liver of the laying hens, during the treatment period and the depletion period of feeding with feed, containing lasalocid (3.2 mg / kg).

Iz preglednice 23 je razvidno, da smo vzorce jeter analizirali od prvega do dvanajstega dne poskusa z naslednjo dinamiko: od prvega do šestega dne po dva vzorca, sedmi dan šest vzorcev, deveti in deseti dan po trije vzorci in enajsti ter dvanajsti dan po dva vzorca. Skupno smo analizirali 28 vzorcev jeter kokoši. Vrednost MRL za jetra za neciljne živali (50 µg/kg) je bila presežena pri šestih vzorcih analiziranih jeter, pri enem vzorcu je bila 50 µg/kg; medtem ko vrednosti MRL za piščance in purane (300 µg/kg) niso bile presežene pri nobenem analiziranem vzorcu jeter kokoši nesnic (slika 21).

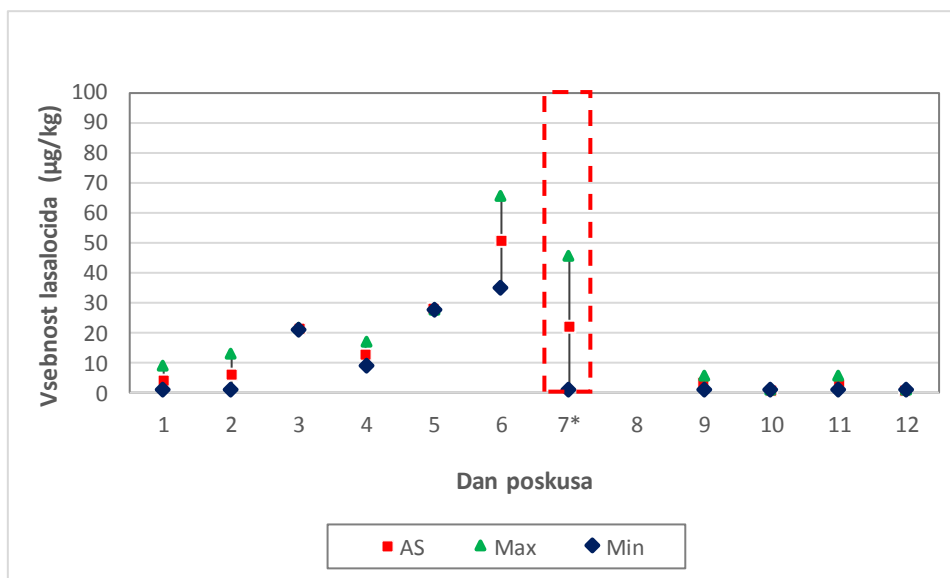
#### 4.2.2 Ledvica

**Preglednica 24:** Vsebnost lasalocida v ledvicah kokoši krmljenih s 3,2 mg lasalocida/kg krme; povprečne, najvišje in najnižje vrednosti vsebnosti lasalocida izražene v  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

**Table 24:** Residue concentration of lasalocid in kidney of laying hens ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), fed with lasalocid 3.2 mg/kg feed; average, maximum and minimum values.

\*dnevi krmljenja z lasalocidom

Število vzorcev (n)	Dan poskusa										
	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	9	10	11	12
1	9	< 1	22	17	28	35	46	5	< 1	< 1	< 1
2	< 1	13	21	9		66	33	< 1	< 1	6	< 1
3							24	6	< 1		
4							< 1				
5							8				
6							22				
n	2	2	2	2	1	2	6	3	3	2	2
AS	4,5	6,5	21,5	13,0	28,0	50,5	22,2	3,7	< 1	3,0	< 1
Max	9	13	22	17	28	66	46	6	< 1	6	< 1
Min	< 1	< 1	21	9	28	35	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1



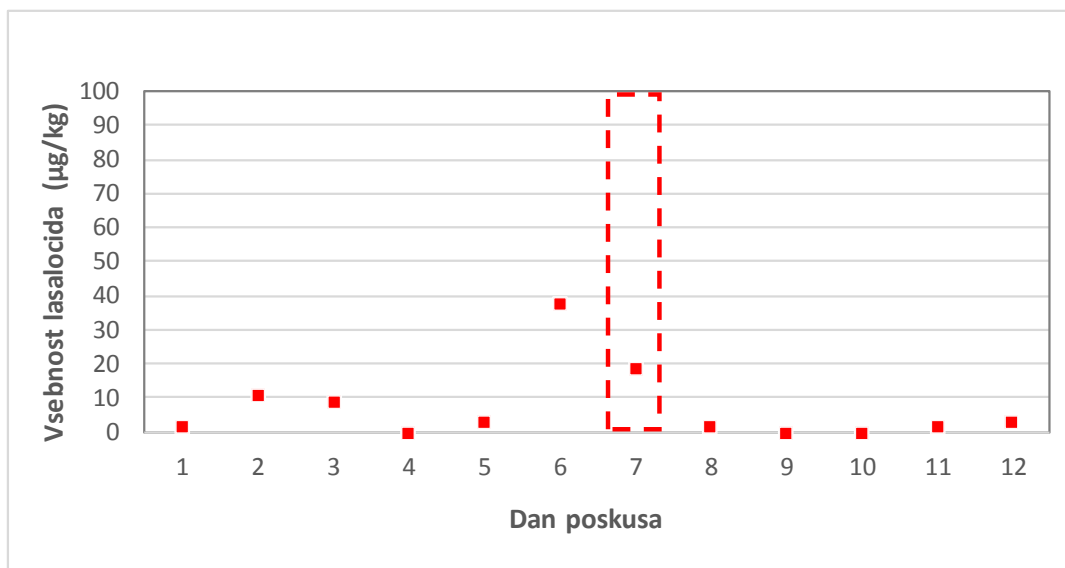
\*zadnji dan krmljenja z lasalocidom

**Slika 22:** Prikaz prisotnosti lasalocida v ledvicah kokoši nesnic, izraženih v  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (3,2 mg/kg).

**Figure 22:** The presence of lasalocid in the kidneys of laying hens ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), during the treatment period and the depletion period of feeding with feed, containing lasalocid (3.2 mg/kg).

Iz preglednice 24 in slike 22 preiskovanih vzorcev ledvic kokoši vidimo, da smo analize opravljali od prvega do dvanajstega dne poskusa. Od prvega do četrtega dne ter šesti, enajsti in dvanajsti dan smo analizirali po dva vzorca, peti dan en vzorec, sedmi dan šest vzorcev ter deveti in deseti dan tri vzorce. Skupno smo analizirali 27 vzorcev ledvic. Vrednost MRL za neciljne živali (20 µg/kg) je bila presežena pri devetih vzorcih. Vrednost MRL za piščance in purane (150 µg/kg) ni bila presežena pri nobenem analiziranem vzorcu.

#### 4.2.3 Koža z maščobo



\*zadnji dan krmljenja z lasalocidom

**Slika 23:** Prikaz prisotnosti povprečnih vrednosti lasalocida v koži z maščobo, izraženih v µg/kg, med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (3,2 mg/kg).

**Figure 23:** The presence of average values of lasalocid in skin with fat, (µg/kg), during the treatment period and the depletion period of feeding with feed, containing lasalocid (3.2 mg / kg).

Iz slike 23 je razvidno, da smo analize vzorcev kože z maščobo opravljali od prvega do dvanajstega dne poskusa. Iz odvzetega tkiva na posamezen dan poskusa smo pripravili skupne vzorce za analizo, zato podajamo tudi povprečne vrednosti. Ugotovljene vsebnosti lasalocida v koži z maščobo so bile nizke; najvišja povprečna vsebnost je bila ugotovljena 6 dan poskusa, bila je 35 µg/kg. Po prenehanju dajanja krme z lasalocidom, se njegova vsebnost v koži z maščobo hitro zmanjša do meje zaznavanja (<1 µg/kg).

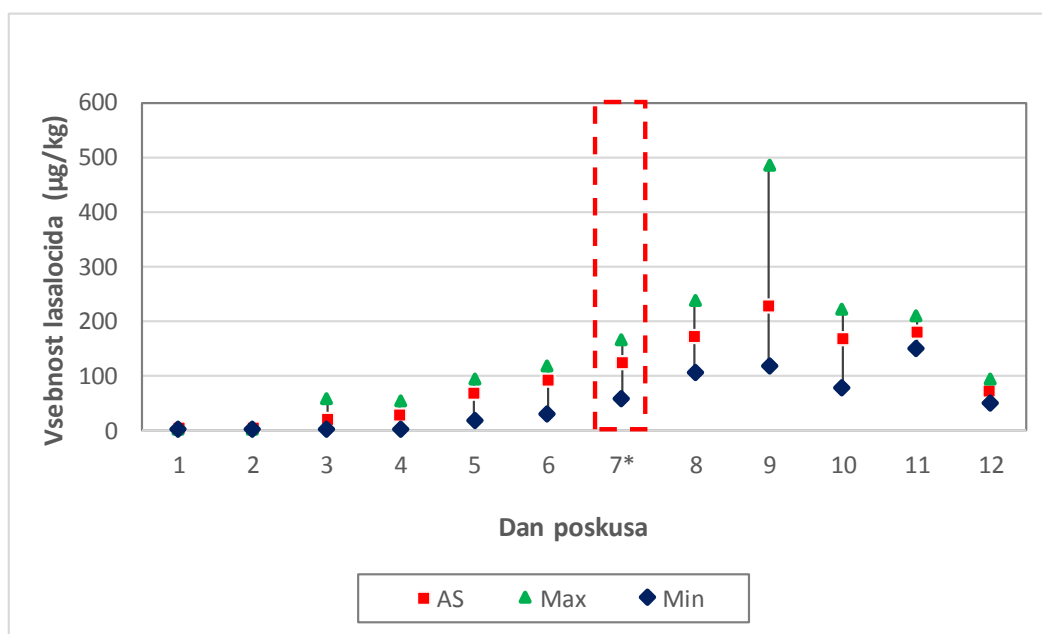
#### 4.2.4 Rumenjaki

**Preglednica 25:** Vsebnost lasalocida v jajčnem rumenjaku kokoši, krmljenih z 3,2 mg lasalocida/kg krme; povprečne, najvišje in najnižje vrednosti izražene v  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

**Table 25:** Residue concentration of lasalocid ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), in egg yolks of hens, feed with 3.2 mg of lasalocid/kg feed; average, maximum and minimum values.

Število vzorcev (n)	Dan poskusa											
	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8	9	10	11	12
1	<5	<5	19	32	18	120	61	177	173	222	212	76
2	<5	<5	<5	24	48	110	166	240	487	211	150	94
3	<5	<5	28	23	94	31	155	108	120	175		52
4	<5	<5	<5	34	97	104	133		209	80		
5	<5	<5	20	<5	93	71	110		149	111		
6	<5	<5	60	56	64	114	128		238	223		
n	6	6	6	6	6	6	6	3	6	6	2	3
AS	<5	<5	21,2	28,2	69,0	91,7	125,5	175,0	229,3	170,3	181,0	74,0
Max	<5	<5	60	56	97	120	166	240	487	223	212	94
Min	<5	<5	<5	<5	18	31	61	108	120	80	150	52

\*dnevi krmljenja z lasalocidom



\*zadnji dan krmljenja z lasalocidom

**Slika 24:** Prikaz prisotnosti lasalocida v jajčnem rumenjaku, med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (3,2 mg/kg).

**Figure 24:** The presence of lasalocid in egg yolks ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), during the treatment period and the depletion period of feeding with feed, containing lasalocid (3.2 mg/kg).

Iz preglednice 25 je razvidno, da smo skupno analizirali 62 vzorcev rumenjakov. Vrednosti MRL za jajca (150 µg/kg) so bile prvič presežene sedmi dan poskusa, največjo vrednost lasalocida v rumenjaki smo ugotovili deveti dan poskusa, vrednosti pod MRL za jajca smo ugotovili peti dan po prenehanju dajanja lasalocida.

Slika 24 prikazuje dinamiko pojavljanja in izginjanja lasalocida iz rumenjakov kokoši, med in po prenehanju dajanja krme, ki je vsebovala lasalocid.

V preglednici 26 podajamo osnovne statistične podatke analiziranih rumenjakov po dnevih poskusa, pri dajanju krme, ki je vsebovala lasalocid (3,2 mg/kg krme).

**Preglednica 26:** Poskus krmljenja kokoši nesnic s 3,2 mg lasalocida/kg krme; povprečna vrednost (AS), standardni odklon (SD), standardna napaka (SE), mediana (Me), kvartilni razmik (Q3–Q1), najnižja (Min), najvišja (Max) vrednost in število analiziranih rumenjakov po dnevih poskusa.

**Table 26:** Experiment: feeding laying hens with 3.2 mg of lasalocid/ kg feed; the average value (AS), standard deviation (SD), standard error (SE), median (Me), interquartile range (Q3–Q1) and lowest (Min), maximum (Max) value and the number of egg yolks, analyzed daily in the whole duration of the experiment.

Dnevi poskusa	N	AS	SD	SE	Me	Q3-Q1	Min	Max
3*	6	21,17	22,17	9,05	19,50	36,00-0,00	0,00	60,00
4*	6	28,17	18,23	7,44	28,00	39,50-17,25	0,00	56,00
5*	6	69,00	31,79	12,98	78,50	94,75-40,50	18,00	97,00
6*	6	91,67	34,34	14,02	107,00	115,50-61,00	31,00	120,00
7*	6	125,50	37,35	15,25	130,50	157,75-97,75	61,00	166,00
9	6	229,33	133,01	54,30	191,00	300,25-141,75	120,00	487,00
10	6	170,33	61,32	25,03	193,00	222,25-103,25	80,00	223,00
Skupaj	42	105,02	90,61	13,98	95,50	150,50-31,75	0,00	487,00

\*dnevi krmljenja z lasalocidom

Opomba: S statistično obdelavo podatkov smo zajeli podatke od tretjega do desetega (brez osmega) dne poskusa.

S Kruskal–Wallis H testom smo dokazali, da obstaja statistično značilna razlika v vsebnosti lasalocida v jajčnem rumenjaku po posameznih dnevih ( $\chi^2(6) = 31,639, p = 0,000$ ).

Z Mann–Whitney testom (preglednica 27) smo preverili med katerimi dnevi v poskusu obstaja statistično značilna razlika. Ugotovili smo, da med zaporednimi dnevi v poskusu statistično

značilnih razlik ne beležimo, obstaja statistično značilna razlika med ključnimi mejniki opazovanja, npr. med tretjim in sedmim dnem, ( $U = 0,000$ ;  $P = 0,004$ ;  $AS(3) = 21,17$ ,  $Me = 19,50$ ;  $AS(7) = 125,50$ ;  $Me(7) = 130,50$ ), med četrtem in sedmim dnem, ( $U = 0,000$ ;  $P = 0,004$ ,  $AS(4) = 28,17$ ;  $Me(4) = 28,00$ ;  $AS(7) = 125,50$ ;  $Me(7) = 130,50$ ); med petim in devetim dnem ( $U = 0,000$ ;  $P = 0,004$ ;  $AS(5) = 69,00$ ;  $Me(5) = 78,50$ ;  $AS(9) = 229,33$ ;  $Me(9) = 191,00$ ); ter med šestim in desetim dnem ( $U = 6,000$ ;  $P = 0,055$ ;  $AS(6) = 91,67$ ;  $Me(6) = 107,00$ ;  $AS(10) = 170,33$ ;  $Me(10) = 193,00$ ).

**Preglednica 27:** Vrednosti Mann-Whitney U-testa za rumenjake kokoši nesnic, krmljenih s krmo, ki je vsebovala lasalocid (3,2 mg/kg), v primerih, ko med dnevi obstaja statistično značilna razlika (P).

**Table 27:** The values of the Mann-Whitney U-test for egg yolks of laying hens, fed with feed containing lasalocid (3.2 mg / kg), in cases within the days where there is a statistically significant difference (P).

*Dan <sup>1</sup>	*Dan <sup>2</sup>	U	P
3	5	5,000	0,037
3	6	1,000	0,006
3	7	0,000	0,004
3	9	0,000	0,004
3	10	0,000	0,004
4	6	3,000	0,016
4	7	0,000	0,004
4	9	0,000	0,004
4	10	0,000	0,004
5	7	4,000	0,025
5	9	0,000	0,004
5	10	3,000	0,016
6	9	0,500	0,005
6	10	6,000	0,055
7	9	6,000	0,055

\*legenda: Med seboj primerjamo dan<sup>1</sup> in dan<sup>2</sup>





Vzorci jajčnih foliklov smo odvzeli sedmi dan poskusa, to je zadnji dan krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid. Skupno smo analizirali dvainsedemdeset jajčnih foliklov od šestih žrtvovanih živali (preglednica 28). Dobljene podatke smo statistično ovrednotili (preglednica 29).

**Preglednica 29:** Povprečna vrednost (AS), standardni odklon (SD), mediana (Me), kvartilni razmik (Q3–Q1) analiziranih foliklov kokoši, ter povezanost med maso folikla in koncentracijo lasalocida v foliklih ( $R_s$ ) sedmi dan krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (3,2 mg/kg).

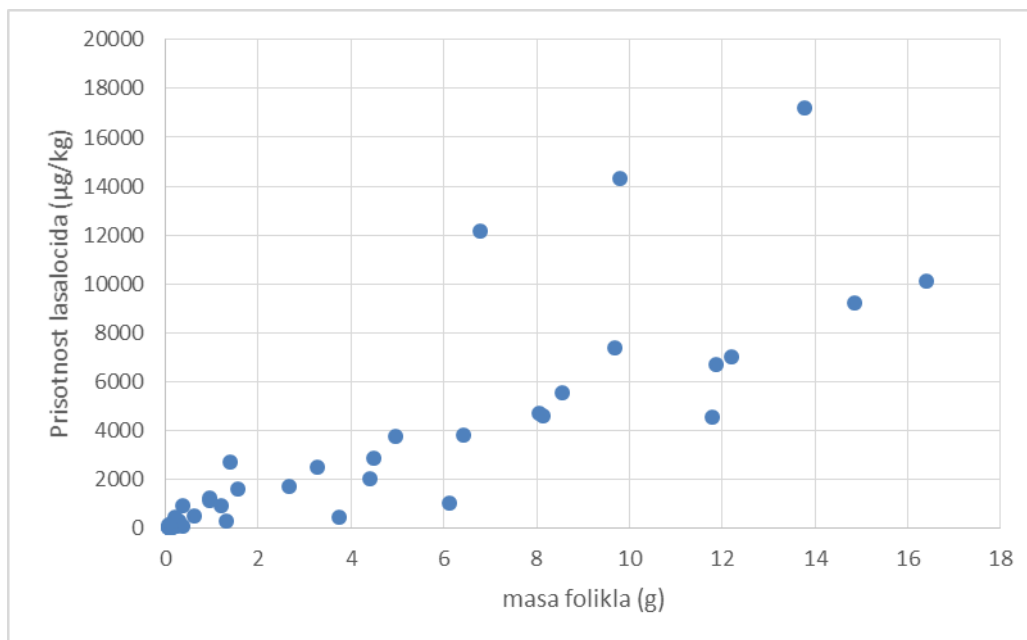
**Table 29:** The average value (AS), standard deviation (SD), median (Me), interquartile range (Q3–Q1) for the analyzed follicles and the connection between the mass of the follicle and the concentration of lasalocid in follicles ( $R_s$ ), on the seventh day of feeding the feed, containing lasalocid (3.2 mg/kg).

		Masa folikla (g)		Koncentracija lasalocida/folikel (µg/kg)		Spearmanov korelacijski koeficient
Kokoš	Število foliklov	AS (SD)	Me (Q3-Q1)	AS (SD)	Me (Q3-Q1)	$R_s$
1	19	1,64 (3,29)	0,16 (0,94-0,11)	1105,16 (1953,99)	197,00 (1230,00-89,00)	0,981**
2	14	3,15 (5,00)	0,26 (5,75-0,10)	1991,57 (3007,38)	181,50 (3960,25-64,75)	0,943**
3	12	3,12 (5,18)	0,26 (5,48-0,17)	2080,33 (3362,13)	152,00 (3302,25-93,25)	0,972**
4	8	4,04 (5,39)	0,87 (9,04-0,09)	5972,38 (7296,43)	1833,00 (13794,25-131,00)	0,994**
5	10	1,18 (2,09)	0,09 (1,92-0,08)	183 (342,67)	10,00 (314,75-3,75)	0,964**
6	9	2,88 (4,31)	0,36 (6,23-0,19)	1426,00 (1911,90)	434,00 (3282,00-146,50)	0,800**
Skupaj	72	2,54 (4,23)	0,20 (3,62-0,10)	1892,92 (3541,07)	199,50 (1951,50-84,00)	0,913**

\*\*Povezanost je statistično značilna pri 1-odstotni stopnji značilnosti ( $p < 0,01$ ).

S Spearmanovim korelacijskim koeficientom smo preverili ali obstaja povezanost med maso jajčnega folikla in vsebnostjo lasalocida v foliklu na celotnem vzorcu (vseh 72 foliklov) in po posameznih kokoših. Iz rezultatov je razvidno, da je povezanost med spremenljivkama v obeh

primerih visoka, saj je koeficient vedno večji od 0,8 (preglednica 29). Ker je poveznost pozitivna, to pomeni, večja kot je masa folikla, večja je vsebnost lasalocida v njem (slika 25).



**Slika 25:** Prikaz povezanosti med maso (g) in koncentracijo lasalocida/folikel ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) sedmi dan krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (3,2 mg/kg).

**Figure 25:** The relation between the mass of the follicle (g) and the concentration of lasalocid / follicle ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) on the seventh day of feeding with feed, containing lasalocid(3.2 mg / kg).

S Kruskal–Waliss H testom smo preverili, ali obstajajo statistično značilne razlike v obeh spremenljivkah (masa folikla in koncentracija lasalocida/folikel) tudi med kokošmi v poskusu. Rezultat testa je pokazal, da med kokošmi ne obstaja statistično značilna razlika v masi folikla ( $\chi^2(5) = 7,450$ ,  $p = 0,189$ ), obstaja pa statistično značilna razlika v koncentraciji lasalocida/folikel ( $\chi^2(5) = 14,460$ ,  $p = 0,013$ ).

Z Mann–Whitney testom smo ugotovili, da odstopa samo peta žival, ki ima zelo nizko vsebnost lasalocida na folikel (AS = 183; Me = 10,00), v primerjavi s povprečnimi vrednostmi vseh analiziranih foliklov (AS = 1892,92; Me = 199,50).

### 4.3 POSKUS 3 (1,1 MG/KG LASALOCIDA V KRMI).

Pri poskusu krmljenja s 1,1 mg lasalocida/kg krme smo analizirali naslednje vzorce tkiv: jetra, kožo z maščobo, rumenjake in jajčne folikle. Vzorce jeter smo analizirali od petega do dvanajstega dne in vzorce kože z maščobo od četrtega do enajstega dne poskusa. Zaradi zakonsko določene dovoljene prisotnosti lasalocida v krmi za neciljne živali (1,25 mg/kg krme, Direktiva Komisije 2009/8, vsebnost je podobna/blizu koncentraciji v našem poskusu), smo vzorce rumenjakov analizirali od prvega do dvanajstega dne poskusa ter tako spremljali nalaganje lasalocida v času krmljenja in padanje v času dajanja krme brez lasalocida. V jajčnih foliklih smo dinamiko nalaganja in izginjanja/padanja lasalocida spremljali od petega do dvanajstega dne poskusa.

#### 4.3.1 Jetra

**Preglednica 30:** Vsebnost lasalocida v jetrih kokoši krmljenih z 1,1 mg lasalocida/kg krme; povprečne, najvišje in najnižje vrednosti vsebnosti, izražene v  $\mu\text{g}/\text{kg}$  po posameznih dnevih in številu vzorcev.

**Table 30:** Residue concentrations ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) of lasalocid in the liver of hens, fed with lasalocid 1.1 mg/kg feed; the average, maximum and minimum values, for individual days of the experiment and the number of samples.

Število vzorcev (n)	Dan poskusa							
	5*	6*	7*	8	9	10	11	12
1	< 5	33	< 5	19	< 5	< 5	< 5	< 5
2	< 5	37	10	36		< 5	< 5	< 5
3	< 5	< 5	< 5	5				
4				15				
5				23				
n	3	3	3	5	1	2	2	2
AS	< 5	23	3	20	< 5	< 5	< 5	< 5
Max	< 5	37	10	36	< 5	< 5	< 5	< 5
Min	< 5	< 5	< 5	5	< 5	< 5	< 5	< 5

\*dnevi krmljenja z lasalocidom

Iz preglednice 30 je razvidno, da smo skupno analizirali enaindvajset vzorcev jeter kokoši. Analize smo opravljali od petega do dvanajstega dne poskusa z naslednjo dinamiko: peti, šesti in sedmi dan poskusa (med krmljenjem z lasalocidom) smo analizirali po tri vzorce, osmi dan

(prvi dan po prenehanju krmljenja) pet vzorcev, deveti dan en vzorec ter deseti, enajsti in dvanajsti dan po dva vzorca. Nobena ugotovljena vrednost ni presegala vrednosti MRL za jetra.

#### 4.3.2 Koža z maščobo

**Preglednica 31:** Vsebnost lasalocida v koži z maščobo kokoši krmljenih z 1,1 mg lasalocida/kg krme; povprečne vrednosti izražene v  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

**Table 31:** The average values of residue concentrations ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) of lasalocid in skin with fat from laying hens, fed with lasalocid 1.1 mg/kg feed.

	Dan poskusa							
Število vzorcev	4*	5*	6*	7*	8	9	10	11
n	3	3	3	5	3	3	3	2
AS	<1	<1	<1	<1	28	<1	<1	<1

\*dnevi krmljenja z lasalocidom

Iz preglednice 31 je razvidno, da smo analize kože z maščobo opravljali od četrtega do enajstega dne poskusa. Prisotnost lasalocida smo ugotovili le v vzorcu, odvzetem osmi dan poskusa (prvi dan po prenehanju dajanja lasalocida), bila je 28  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . V vseh ostalih dnevih lasalocida nismo določili (<1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

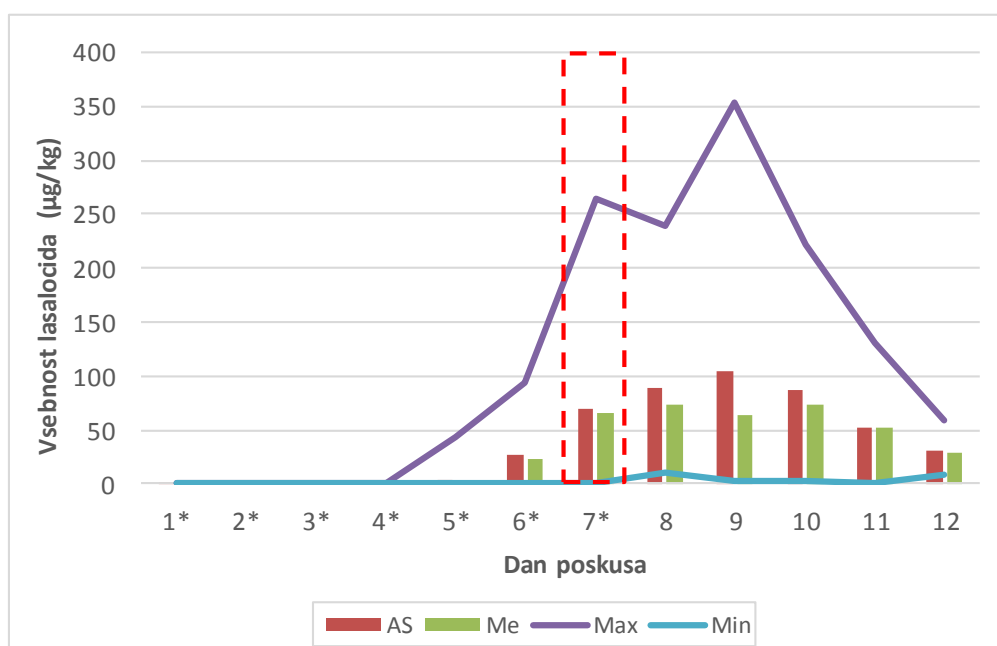
### 4.3.3 Rumenjaki

**Preglednica 32:** Vsebnost lasalocida v jajčnih rumenjakih kokoši krmljenih z 1,1 mg lasalocida/kg krme; povprečne, najvišje in najnižje vrednosti, izražene v µg/kg.

**Table 32:** Residue concentrations (µg/kg) of lasalocid in egg yolks of hens, fed with 1.1 mg of lasalocid/kg feed; average, maximum and minimum values.

Število vzorcev (n)	Dnevi poskusa											
	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8	9	10	11	12
1	<5	<5	<5	<5	64	24	11	66	64	134	68	58
2	<5	<5	<5	<5	93	142	7	41	312	176	79	9
3	<5	<5	<5	43	23	<5	265	123	154	73	131	27
4	<5	<5	<5	<5	23	57	102	240	54	200	64	34
5	<5	<5	<5	<5	<5	71	<5	47	353	92	<5	29
6	<5	<5	<5	<5	<5	24	6	88	86	97	13	
7	<5	<5	<5	<5	13	34	139	83	154	222	53	
8	<5	<5	<5	<5	19	69	24	215	23	17	45	
9	<5	<5	<5	<5	20	42	87	73	15	<5	19	
10	<5	<5	<5	<5	30	36	111	10	<5	53		
11					23	<5	65	83	27	44		
12					38	<5	7	41	29	<5		
13					<5	23	80	42	79	24		
n	10	10	10	10	13	13	13	13	13	13	9	5
AS	<5	<5	<5	4,3	26,9	38,4	61,8	82,5	102,5	87,1	52,4	31,4
Max	0	0	0	43	93	142	265	240	353	222	131	58
Min	0	0	0	<5	<5	<5	<5	10	<5	3	<5	58

\*dnevi krmljenja z lasalocidom



\*dnevi krmljenja z lasalocidom

**Slika 26:** Prikaz prisotnosti lasalocida v jajčnem rumenjaku v µg/kg, med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (1,1 mg/kg).

**Figure 26:** The presence of lasalocid in the egg yolks (µg/kg), during the treatment period and the depletion period of feeding with feed, containing lasalocid (1.1 mg / kg).

Iz preglednice 32 in slike 26 je razvidno, da smo lasalocid prvič ugotovili pri enem vzorcu jajčnega rumenjaka že četrty dan dajanja krme z lasalocidom, vsebnost v rumenjaku je bila 43 µg/kg; pri vseh ostalih vzorcih so bili rezultati pod mejo zaznavnosti (< 5 µg/kg).

Skupno smo analizirali 132 vzorcev jajčnega rumenjaka z naslednjo dinamiko: od prvega do petega dne deset vzorcev, od petega do desetega dne trinajst vzorcev, enajsti dan devet vzorcev in dvanajsti dan pet vzorcev. Zadnje analize smo opravili dvanajsti dan, to je pet dni po prenehanju krmljenja z lasalocidom, ko smo lasalocid ugotovili pri vseh analiziranih vzorcih; vsebnosti so bile 9 µg/kg, 27 µg/kg, 29 µg/kg, 34 µg/kg in 58 µg/kg. V enem vzorcu rumenjaka smo vsebnost nad vrednostjo MRL za jajca ugotovili sedmi dan poskusa, bila je 265 µg/kg, najvišja ugotovljena vsebnost je bila 353 µg/kg deveti dan poskusa; vrednosti nad MRL smo ugotavljali še tri dni po prenehanju dajanja krme z lasalocidom (176, 200, 222 µg/kg). Lasalocid smo v rumenjakih ugotovili še dvanajsti dan poskusa (pet dni po prenehanju dajanja krme z lasalocidom), bile so 9, 27, 29, 34 in 58 µg/kg.

**Preglednica 33:** Poskus krmljenja kokoši nesnic z 1,1mg lasalocida/kg krme; povprečna vrednost (AS), standardni odklon (SD), standardna napaka (SE), mediana (Me), kvartilni razmik (Q3–Q1), najnižja (Min), najvišja (Max) vrednost in število analiziranih rumenjakov po dnevih poskusa.

**Table 33:** Experiment: feeding laying hens with 1.1 mg of lasalocid/kg feed; the average value (AS), standard deviation (SD), standard error (SE), median (Me), interquartile range (Q3–Q1) and lowest (Min), maximum (Max) value and the number of egg yolks, analyzed by day of the experiment.

<b>Dan poskusa</b>	<b>N</b>	<b>AS</b>	<b>SE</b>	<b>SD</b>	<b>Me</b>	<b>Q3–Q1</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
1*	10	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00-1,00	1,00	1,00
2*	10	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00-1,00	1,00	1,00
3*	10	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00-1,00	1,00	1,00
4*	10	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00-1,00	1,00	1,00
5*	13	4,23	3,23	11,65	1,00	1,00-1,00	1,00	43,00
6*	13	27,08	7,20	25,97	23,00	34,00-8,50	1,00	93,00
7*	13	69,62	20,92	75,44	65,00	106,50-7,00	1,00	265,00
8	13	88,62	18,86	68,01	73,00	105,50-41,50	10,00	240,00
9	13	104,00	31,19	112,46	64,00	154,00-25,00	2,00	353,00
10	13	87,62	20,76	74,87	73,00	155,00-20,50	3,00	222,00
11	9	52,56	13,24	39,73	53,00	73,50-16,00	1,00	131,00
12	5	31,40	7,88	17,62	29,00	46,00-18,00	9,00	58,00
Skupaj	132	42,61	5,75	66,07	12,00	64,00-1,00	1,00	353,00

\*dnevi krmljenja z lasalocidom

Opomba: Pri statistični obdelavi smo pri rezultatih pod mejo zaznavnosti (< 5, od prvega do petega dne, preglednica 33), uporabili vrednost 1. Višje vrednosti bi vplivale na rezultate statistične obdelave podatkov.

S Kruskal–Wallis H testom smo dokazali, da obstaja statistično značilna razlika v vsebnosti lasalocida v jajčnem rumenjaku po posameznih dnevih poskusa ( $\chi^2(11) = 95,476$ ;  $p = 0,000$  in  $\chi^2(7) = 35,701$ ;  $p = 0,000$ ). Med katerimi dnevi obstaja razlika, smo preverili z Mann–Whitney testom. Pri tem smo upoštevali ključne mejnike, in sicer peti dan, ko smo lasalocid ugotovili v večini vzorcev, sedmi dan (prenehanje krmljenja z lasalocidom) in dvanajsti dan (zadnji dan poskusa). Kot pričakovano se je izkazalo, da med zaporednimi dnevi (npr. med šestim in sedmim, med sedmim in osmim dnevom) statistično značilna razlika v vsebnosti lasalocida ne obstaja, obstaja pa statistično značilna razlika med ključnimi dnevi (mejniki) v poskusu; npr. med petim in osmim dnevom ( $U = 4,000$ ;  $P = 0,000$ ;  $AS(5) = 4,23$ ;  $Me(5) = 1,00$ ;  $AS(8) = 88,62$ ;

Me (8) = 73,00) in med osmim in dvanajstim dnevom ( $U = 8,00$ ;  $P = 0,016$ ;  $AS(8) = 88,62$ ;  $Me(8) = 73,00$ ;  $AS(12) = 31,40$ ;  $Me(12) = 29,00$ ).

#### **4.3.4 Jajčni folikli**

Vzorci jajčnih foliklov smo analizirali od petega do dvanajstega dne poskusa po naslednji dinamiki: peti dan smo žrtvovali pet kokoši, skupno je bilo analiziranih 18 foliklov, šesti dan pet kokoši in 19 foliklov, sedmi dan sedem kokoši in 27 foliklov, osmi dan sedem kokoši in 33 foliklov, deveti dan pet kokoši in 17 foliklov, deseti dan pet kokoši in 15 foliklov, enajsti dan sedem kokoši in 23 foliklov ter dvanajsti dan ena kokoš in en folikel. Skupno smo analizirali 153 foliklov od 43 kokoši.

Osnovne statistične podatke za vseh 153 analiziranih foliklov od petega do dvanajstega dne poskusa, prikazujemo v preglednici 34.

Podrobneje smo proučili dinamiko nalaganja in izginjanja lasalocida v jajčnih foliklih ter povezavo med maso folikla in vsebnostjo lasalocida. S Kruskal-Wallis H testom (neparametrični test za več neodvisnih vzorcev) smo preverili, ali obstaja statistično značilna povezava med maso folikla in koncentracijo lasalocida/folikel pri kokoši na določen dan poskusa ter med vsemi kokošmi v poskusu. Z Mann-Whitney testom pa smo preverili, med katerimi dnevi in kokošmi v poskusu obstaja statistično značilna razlika, s Spearmanovim koeficientom ( $R_s$ ) pa smo preverili povezavo med dvema spremenljivkama (maso folikla in koncentracijo lasalocida na folikel).



**Preglednica 34:** Povprečna vrednost (AS), standardni odklon (SD), mediana (Me), kvartilni razmik (Q3–Q1) ter povezanost med maso folikla in koncentracijo lasalocida v foliklih ( $R_s$ ) v analiziranih foliklih kokoši od petega do dvanajstega dne krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (1,1 mg/kg).

**Table 34:** The average value (AS), standard deviation (SD), median (Me), interquartile range (Q3–Q1) and the relation between mass and concentration of lasalocid follicles ( $R_s$ ) for the analyzed follicles from the fifth to the twelfth day of experimental feeding of laying hens with feed, containing lasalocid (1.1 mg / kg).

		Masa folikla (g)		Koncentracija lasalocida / folikel (µg/kg)		Spearmanov korelacijski koeficient
Dan poskusa	N	AS (SD)	Me (Q3–Q1)	AS (SD)	Me (Q3–Q1)	$R_s$
5*	18	5,41 (5,75)	3,06 (12,480- 0,32)	154,94 (160,43)	121,00 (235,25- 9,50)	0,893**
6*	19	6,80 (6,38)	5,67 (14,320-0,72)	452,26 (392,16)	321,00 ( 873,00-120,00)	0,846**
7*	27	5,65 (6,00)	2,70 (11,74- 0,22)	281,26 (360,00)	129 (435,00-35,00)	0,730**
8	33	4,33 (5,42)	1,25 (9,32- 0,18)	346,15 (491,10)	66,00 (618,50-15,00)	0,807**
9	17	6,50 (6,04)	3,76 (12,16- 1,12)	177,41 ( 192,99)	82,00 (372,00-25,00)	0,919**
10	15	6,66 (6,25)	4,96 (19,70- 0,52)	159,36 (282,09)	24,00 (193,00-13,00)	0,956**
11	23	6,94 (6,52)	4,90 (12,30- 0,26)	84,48 (96,23)	49,00 (140,00-10,00)	0,894**
12	1	14,13	14,13 (14,13- 14,13)	85,00	85 (85,00-85,00)	
Skupaj	153	591 (5,99)	3,70 (11,18- 0,27)	247,27 (347,43)	85,00 (328,00- 18,00)	

\*dnevi krmljenja z lasalocidom

\*\*Povezanost je statistično značilna pri 1-odstotni stopnji značilnosti ( $p < 0,01$ ).

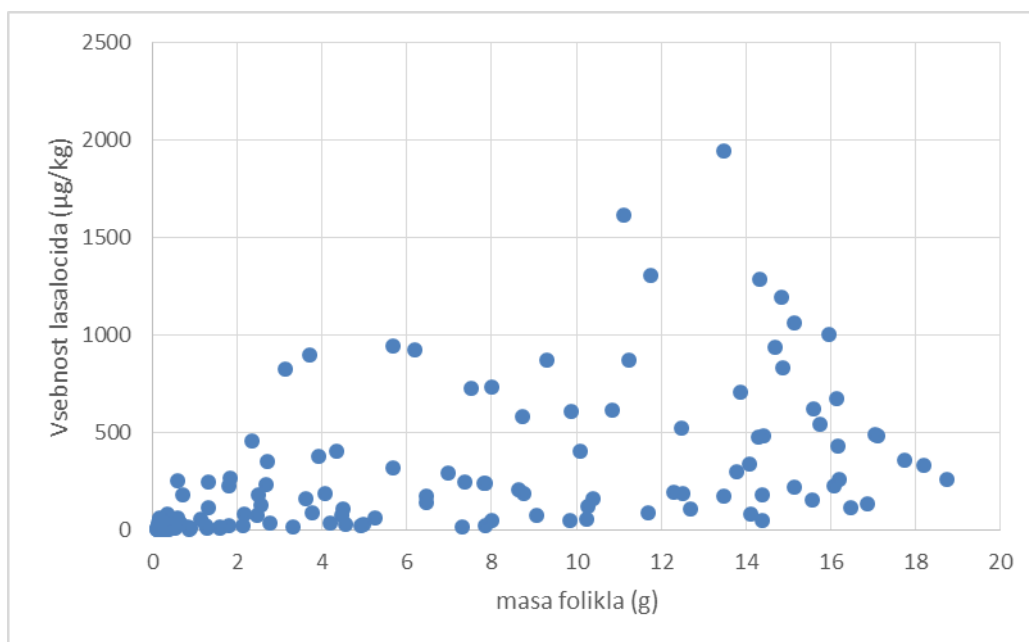
Kruskal–Wallis test je pokazal, da obstaja statistično značilna razlika med posameznimi dnevi poskusa v primeru koncentracije lasalocida na maso folikla ( $\chi^2(6) = 17,224$ ,  $p = 0,008$ ), v primeru same mase folikla pa ne ( $\chi^2(6) = 5,156$ ,  $p = 0,524$ ).

Vsebnost lasalocida v foliklih narašča z dnevi krmljenja do osmega dne (peti dan je AS = 154,94, Me=121,00; osmi dan je AS = 346,15; Me =66,00), nato pa zopet pada (enajsti dan je AS = 84,48, Me= 49,00).

Z Mann–Whitney testom smo ugotovili, da obstaja statistično značilna razlika v koncentraciji lasalocida/folikel samo med petim in šestim dnevom poskusa, sicer pa statistično značilnih razlik med dnevi ne beležimo. Očitno je, da so pri tako nizki koncentraciji lasalocida v krmi,

razlike v vsebnosti lasalocida v rumenjaki in foliklih izredno majhne in zaradi tega ne moremo potrditi statistično značilne razlike med posameznimi dnevi v poskusu.

S Spearmanovim korelacijskim koeficientom smo preverili ali obstaja povezanost med obema spremenljivkama (med maso folikla in koncentracijo lasalocida/folikel) in ugotovili, da je povezanost med spremenljivkama pri vseh dnevih pozitivna in dokaj visoka, saj je koeficient vedno večji od 0,7 (slika 27).



**Slika 27:** Prikaz povezanosti med maso (g) in koncentracijo lasalocida/folikel ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) po dnevih, pri krmljenju kokoši s krmo, ki je vsebovala lasalocid (1,1 mg/kg).

**Figure 27:** The relation between mass (g) and the concentration of lasalocid/follicle ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) by day of the experiment after the feeding of laying hens with feed, containing lasalocid (1.1 mg/kg).

Z enakimi testi smo preverili tudi rezultate analiziranih foliklov pri posamezni kokoši na določen dan poskusa. Rezultate prikazujemo v preglednicah od 35 do 41.

**Preglednica 35:** Povprečna vrednost (AS), standardni odklon (SD), mediana (Me), kvartilni razmik (Q3–Q1) ter povezanost med maso folikla in koncentracijo lasalocida v foliklih ( $R_s$ ) v analiziranih foliklih kokoši peti dan krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (1,1 mg/kg).

**Table 35:** The average value (AS), standard deviation (SD), median (Me), interquartile range (Q3–Q1) and the relation between mass and concentration of lasalocid in follicles ( $R_s$ ) for the analyzed follicles, on the fifth day of feeding laying hens with feed, containing lasalocid (1.1 mg/kg).

		Masa folikla (g)		Koncentracija lasalocida/folikel (µg/kg)		Spearmanov korelacijski koeficient
Kokoš	N	AS (SD)	Me (Q3-Q1)	AS (SD)	Me (Q3-Q1)	$R_s$
1	3	5,67 (7,66)	2,50 (/ - 0,10)	277,67 (241,84)	185,00 (0 -10,00)	1,000**
2	4	4,70 (7,66)	1,30 (12,67- ,12)	80,50 (104,69)	42,00 (191,50-8,0)	0,949
3	3	6,18 (5,66)	4,67 (0-1,57)	92,67 (88,20)	76,00 (0 - 14,00)	1,000**
4	5	4,14 (4,50)	3,61 (8,270- 27)	178,40 (211,94)	166 (357,00-5,50)	1,000**
5	3	7,42 (6,32)	7,37 (/ - 1,13)	204,67 (127,95)	251,00 (0 -60,00)	1,000**
Skupaj	18	5,41 (5,75)	3,06 (12,48-0,32)	154,94 (160,43)	121,00 (235,25-9,50)	0,893**

\*\*Povezanost je statistično značilna pri 1-odstotni stopnji značilnosti ( $p < 0,01$ ).

Opomba: Pri kokoših z majhnim številom jajčnih foliklov (od ena do tri), ni bilo možno izračunati vrednosti kvartilnega razmika, kar je v tabeli prikazano z » / «.

Kruskal–Wallis test je pokazal, da ne obstaja statistično značilna razlika med kokošmi tako v primeru koncentracije lasalocida na maso folikla ( $\chi^2(4) = 2,063$ ,  $p = 0,724$ ), kot v primeru same mase folikla ( $\chi^2(4) = 1,390$ ,  $p = 0,846$ ).

Če rezultati Kruskal–Wallis testa niso statistično značilni, podatkov ni potrebno preverjati z nadaljnjimi testi.

**Preglednica 36:** Povprečna vrednost (AS), standardni odklon (SD), mediana (Me), kvartilni razmik (Q3–Q1) ter povezanost med maso folikla in koncentracijo lasalocida v foliklih ( $R_s$ ) v analiziranih foliklih kokoši šesti dan krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (1,1 mg/kg).

**Table 36:** The average value (AS), standard deviation (SD), median (Me), interquartile range (Q3–Q1) and the relation between mass and concentration of lasalocid in follicles ( $R_s$ ) for the analyzed follicles, on the sixth day of feeding laying hens with feed, containing lasalocid (1.1 mg/kg).

Kokoš	N	Masa folikla (g)		Koncentracija lasalocida/folikel (µg/kg)		Spearmanov korelacijski koeficient
		AS (SD)	Me (Q3-Q1)	AS (SD)	Me (Q3-Q1)	$R_s$
1	4	6,7 (8,06)	4,55 (15,27-0,47)	183 (149, 30)	180,50 (329,50-40,50)	1,000**
2	5	4,52 (6,80)	0,72 (10,80-0,15)	3,16 (403,37)	181,00 (633,50-37,00)	1,000**
3	3	8,60 (6,46)	9,30 (/ - 1,83)	693,33 (370,72)	873,00 (0-267,00)	1,000**
4	3	7,27 (6,57)	6,17 (0-1,32)	820 (529,67)	925,00 (0-246,00)	1,000**
5	4	7,80 (6,88)	7,60 (14,8-1,62)	434,25 (290,20)	511,50 (633,00-128,50)	1,000**
Skupaj	19	6,80 (6,38)	5,67 (14,320-0,72)	452,26 (392,16)	321,00 ( 873,00-120,00)	0,846**

\*\*Povezanost je statistično značilna pri 1-odstotni stopnji značilnosti ( $p < 0,01$ ).

Opomba: Pri kokoših z majhnim številom jajčnih foliklov (od ena do tri), ni bilo možno izračunati vrednosti kvartilnega razmika, kar je v tabeli prikazano z » / «.

Kruskal–Wallis test je pokazal, da ne obstaja statistično značilna razlika med kokošmi tako v primeru koncentracije lasalocida na maso folikla ( $\chi^2(4) = 5,737$ ,  $p = 0,220$ ), kot v primeru same mase folikla ( $\chi^2(4) = 2,229$ ,  $p = 0,694$ ).

**Preglednica 37:** Povprečna vrednost (AS), standardni odklon (SD), mediana (Me), kvartilni razmik (Q3–Q1) ter povezanost med maso folikla in koncentracijo lasalocida v foliklih ( $R_s$ ) v analiziranih foliklih kokoši sedmi dan krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (1,1 mg/kg).

**Table 37:** The average value (AS), standard deviation (SD), median (Me), interquartile range (Q3–Q1) and the connection between mass and concentration of lasalocid in follicles ( $R_s$ ) for the analyzed follicles, on the seventh day of feeding laying hens with feed, containing lasalocid (1.1 mg/kg).

		Masa folikla (g)		Koncentracija lasalocida/folikel ( $\mu\text{g/kg}$ )		Spearmanov korelacijski koeficient
Kokoš	N	AS (SD)	Me (Q3-Q1)	AS (SD)	Me (Q3-Q1)	$R_s$
1	5	5,13 (6,28)	2,34 (11,42-0,25)	501,20 (483,11)	460,00 (965,00-58,00)	1,000**
2	5	2,50 (5,17)	0,17 (5,98-0,16)	302,00 (561,35)	53,00 (685,50-43,00)	0,900*
3	4	4,10 (6,35)	1,40 (10,75-0,15)	83,00 (83,87)	72,50 (165,75-10,75)	1,000**
4	4	5,98 (7,47)	3,77 (13,87-0,29)	204,75 (195,48)	182,00 (400,50-31,75)	1,000**
5	3	9,02 (5,88)	7,32 (/-4,18)	72,00 (73,24)	38,00 (/-22,00)	0,500
6	2	11,33 (6,94)	11,33 (/-6,47)	200,50 (82,73)	200,50 (/-142,00)	1,000
7	4	6,13 (5,95)	5,10 (12,34-0,99)	425,50 (334,64)	529,50 (723,00-105,00)	0,800
Skupaj	27	5,65 (6,00)	2,70 (11,74-0,22)	281,26 (360,00)	129 (435,00-35,00)	0,730**

\*\*Povezanost je statistično značilna pri 1-odstotni stopnji značilnosti ( $p < 0,01$ ).

Opomba: Pri kokoših z majhnim številom jajčnih foliklov (od ena do tri), ni bilo možno izračunati vrednosti kvartilnega razmika, kar je v tabeli prikazano z » / «.

Kruskal–Wallis test je pokazal, da ne obstaja statistično značilna razlika med kokošmi tako v primeru koncentracije lasalocida na maso folikla ( $\chi^2(6) = 5,827$ ,  $p = 0,443$ ), kot v primeru same mase folikla ( $\chi^2(4) = 7,426$ ,  $p = 0,283$ ).

**Preglednica 38:** Povprečna vrednost (AS), standardni odklon (SD), mediana (Me), kvartilni razmik (Q3–Q1) ter povezanost med maso folikla in koncentracijo lasalocida v foliklih ( $R_s$ ) v analiziranih foliklih kokoši osmi dan krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (1,1 mg/kg).

**Table 38:** The average value (AS), standard deviation (SD), median (Me), interquartile range (Q3–Q1) and the connection between mass and concentration of lasalocid in follicles ( $R_s$ ) for the analyzed follicles, on the eighth day of feeding laying hens with feed, containing lasalocid (1.1 mg/kg).

		Masa folikla (g)		Koncentracija lasalocida/folikel ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		Spearmanov korelacijski koeficient
Kokoš	N	AS (SD)	Me (Q3-Q1)	AS (SD)	Me (Q3-Q1)	$R_s$
1	4	4,26 (4,54)	3,25 (9,00-0,51)	59,75 (49,26)	46,00 (111,75-21,50)	1,000**
2	5	2,84 (4,87)	0,20 (6,95-0,13)	230,60 (371,72)	17,00 (554,50-13,50)	0,975**
3	5	1,92 (2,43)	0,59 (4,39-0,13)	418,00 (436,16)	253,00 (883,50-35,00)	1,000**
4	3	5,64 (9,40)	0,32 (/ - 0,15)	44,00 (863,24)	9,00 (/ - 6,00)	1,000**
5	5	5,16 (6,50)	1,88 (11,80-0,19)	331,60 (367,42)	299,00 (709,50-5,00)	0,975**
6	5	6,03 (6,62)	3,90 (12,75-0,37)	331,80 (299,84)	379,00 (618,50-21,50)	1,000**
7	6	4,81 (6,00)	1,98 (11,71-0,17)	748,67 (874,15)	459,50 (1695,25-11,00)	1,000**
Skupaj	33	4,33 (5,42)	1,25 (9,32- 0,18)	346,15 (491,10)	66 (618,50-15,00)	0,807**

\*\*Povezanost je statistično značilna pri 1-odstotni stopnji značilnosti ( $p < 0,01$ ).

Opomba: Pri kokoših z majhnim številom jajčnih foliklov (od ena do tri), ni bilo možno izračunati vrednosti kvartilnega razmika, kar je v tabeli prikazano z » / «.

Kruskal–Wallis test je pokazal, da ne obstaja statistično značilna razlika med kokošmi tako v primeru koncentracije lasalocida na maso folikla ( $\chi^2(6) = 4,227$ ,  $p = 0,646$ ), kot v primeru same mase folikla ( $\chi^2(6) = 2,733$ ,  $p = 0,842$ ).

**Preglednica 39:** Povprečna vrednost (AS), standardni odklon (SD), mediana (Me), kvartilni razmik (Q3–Q1) ter povezanost med maso folikla in koncentracijo lasalocida v foliklih ( $R_s$ ) v analiziranih foliklih kokoši deveti dan krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (1,1 mg/kg).

**Table 39:** The average value (AS), standard deviation (SD), median (Me), interquartile range (Q3–Q1) and the connection between mass and concentration of lasalocid in follicles ( $R_s$ ) for the analyzed follicles, on the ninth day of feeding laying hens with feed, containing lasalocid (1.1 mg/kg).

		Masa folikla (g)		Koncentracija lasalocida/folikel (µg/kg)		Spearmanov korelacijski koeficient
Kokoš	N	AS (SD)	Me (Q3-Q3)	AS (SD)	Me (Q3-Q1)	$R_s$
1	4	6,39 (7,62)	4,14 (14,44-0,58)	175,50 (218,32)	101,50 (407,00-18,00)	1,000**
2	4	7,03 (7,22)	6,10 ( 14,32-0,67)	245,75 (270,04)	214,50 (508,75-14,00)	1,000**
3	3	6,11 (7,29)	3,76 (/-0,29)	200,00 (240,78)	91,00 (/-33,00)	1,000**
4	3	4,27 (5,24)	2,12 (/-0,43)	50,00 (36,66)	58,00 (/-10,00)	0,500
5	3	8,53 (5,74)	8,64 (/-2,87)	193,76 (151,44)	207,00 (/-36,00)	1,000**
Skupaj	17	6,50 (6,04)	3,76 (12,16- 1,12)	177,41 ( 192,99)	82,00 (372,00-25,00)	0,919**

\*\*Povezanost je statistično značilna pri 1-odstotni stopnji značilnosti ( $p < 0,01$ ).

Opomba: Pri kokoših z majhnim številom jajčnih foliklov (od ena do tri), ni bilo možno izračunati vrednosti kvartilnega razmika, kar je v tabeli prikazano z » / «.

Kruskal–Wallis test je pokazal, da ne obstaja statistično značilna razlika med kokošmi tako v primeru koncentracije lasalocida na maso folikla ( $\chi^2(4) = 1,614$ ,  $p = 0,806$ ), kot v primeru same mase folikla ( $\chi^2(4) = 0,676$ ,  $p = 0,954$ ).

**Preglednica 40:** Povprečna vrednost (AS), standardni odklon (SD), mediana (Me), kvartilni razmik (Q3–Q1) ter povezanost med maso folikla in koncentracijo lasalocida v foliklih ( $R_s$ ) v analiziranih foliklih kokoši deseti dan krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (1,1 mg/kg).

**Table 40:** The average value (AS), standard deviation (SD), median (Me), interquartile range (Q3–Q1) and the connection between mass and concentration of lasalocid in follicles ( $R_s$ ) for the analyzed follicles, on the tenth day of feeding laying hens with feed, containing lasalocid (1.1 mg/kg).

		Masa folikla (g)		Koncentracija lasalocida/folikel ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		Spearmanov korelacijski koeficient
Kokoš	N	AS (SD)	Me (Q3-Q1)	AS (SD)	Me (Q3-Q1)	$R_s$
1	4	7,83 (6,24)	7,77 (13,94-1,87)	108,25 (102,34)	96,00 (209,50-19,25)	1,000**
2	3	4,54 (7,14)	0,52 (/-0,13)	44,67 (59,23)	13,00 (/-8,00)	1,000**
3	2	4,56 (4,63)	4,56 (/-1,19)	18,00 (8,55)	18,00 (/-12,00)	1,000
4	4	5,27 (8,03)	1,84 ( 13,61-0,20)	133,25 (238,54)	238,54 (373,25-10,00)	1,000**
5	2	11,95 (4,52)	11,95 (/-8,77)	626,50 (613,06)	626,50 (/-193,00)	1,000
Skupaj	15	6,66 (6,25)	4,96 (19,70- 0,52)	159,36 (282,09)	49,00 (140,00-10,00)	0,956**

\*\*Povezanost je statistično značilna pri 1-odstotni stopnji značilnosti ( $p < 0,01$ ).

Opomba: Pri kokoših z majhnim številom jajčnih foliklov (od ena do tri), ni bilo možno izračunati vrednosti kvartilnega razmika, kar je v tabeli prikazano z » / «.

Kruskal–Wallis test je pokazal, da ne obstaja statistično značilna razlika med kokošmi tako v primeru koncentracije lasalocida na maso folikla ( $\chi^2(4) = 5,730$ ,  $p = 0,220$ ), kot v primeru same mase folikla ( $\chi^2(4) = 3,067$ ,  $p = 0,547$ ).



**Preglednica 41:** Povprečna vrednost (AS), standardni odklon (SD), mediana (Me), kvartilni razmik (Q3–Q1) ter povezanost med maso folikla in koncentracijo lasalocida v foliklih ( $R_s$ ) v analiziranih foliklih kokoši enajsti dan krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (1,1 mg/kg).

**Table 41:** The average value (AS), standard deviation (SD), median (Me), interquartile range (Q3–Q1) and the connection between mass and concentration of lasalocid in follicles ( $R_s$ ) for the analyzed follicles, on the eleventh day of feeding laying hens with feed, containing lasalocid (1.1 mg/kg).

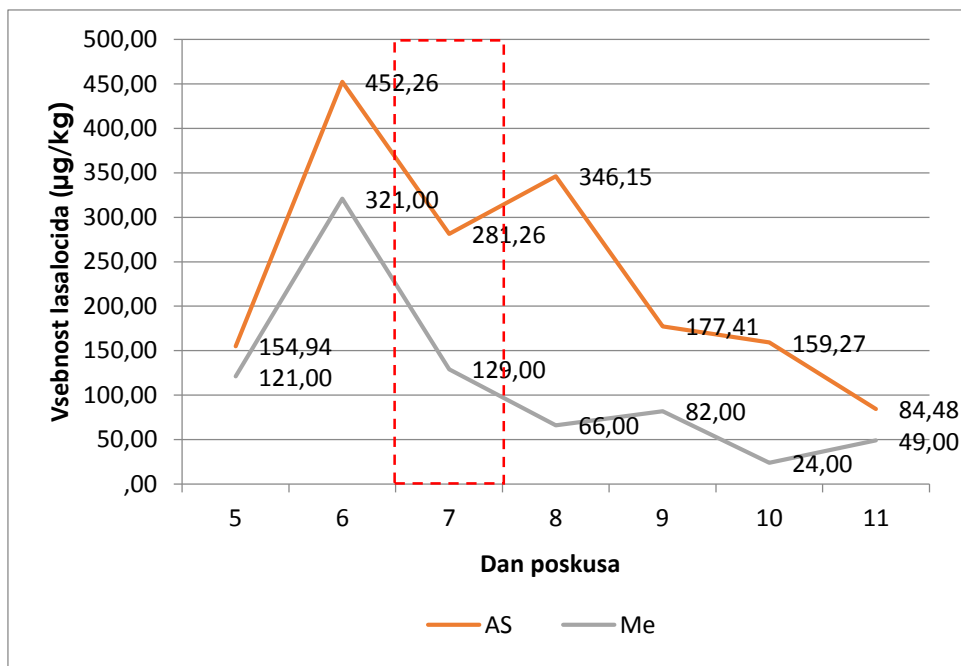
		Masa folikla (g)		Koncentracija lasalocida/folikel (µg/kg)		Spearmanov korelacijski koeficient
Kokoš	N	AS (SD)	Me (Q3-Q1)	AS (SD)	Me (Q3-Q1)	$R_s$
1	4	3,20 (3,73)	2,33 (7,00-0,14)	92,75 (111,01)	59,00 (210,00-9,25)	1,000**
2	2	13,99 (6,86)	13,99 (/-9,05)	168,00 (131,52)	168,00 (/-75,00)	1,000
3	4	4,99 (8,87)	0,57 ( 3,87-0,26)	92,00 (162,01)	12,00 (254,75-9,25)	0,200
4	4	7,93 (6,66)	8,60 (3,87-1,30)	103,50 (99,85)	103,00 (194,25-13,15)	0,800
5	4	6,04 (6,53)	4,82 (12,81-0,53)	32,50 (22,88)	33,00 (53,50-11,00)	1,000**
6	3	5,70 (5,57)	4,55 (/-0,88)	44,67 (41,99)	30,00 (/-12,00)	1,000**
7	2	13,44 (4,86)	13,44 (/-9,85)	95,00 (63,64)	95,00 (/-50,00)	1,000
Skupaj	23	6,94 (6,52)	4,90 (12,30- 0,26)	84,48 (96,23)	49,00 (140,00-10,00)	0,894**

\*\*Povezanost je statistično značilna pri 1-odstotni stopnji značilnosti ( $p < 0,01$ ).

Opomba: Pri kokoših z majhnim številom jajčnih foliklov (od ena do tri), ni bilo možno izračunati vrednosti kvartilnega razmika, kar je v tabeli prikazano z » / «.

Kruskal–Wallis test je pokazal, da ne obstaja statistično značilna razlika med kokošmi tako v primeru koncentracije lasalocida na maso folikla ( $\chi^2(6) = 3,546$ ,  $p = 0,738$ ), kot v primeru same mase folikla ( $\chi^2(6) = 6,560$ ,  $p = 0,363$ ).

Pri vseh dnevih poskusa so rezultati Kruskal–Wallis testa pokazali, da pri obeh opazovanih spremenljivkah (koncentracija lasalocida na maso folikla in masa folikla), ne obstaja statistično značilna razlika med kokošmi. Iz tega lahko sklepamo, da bodo vsebnosti lasalocida v jajčnih foliklih kokoši, ki dobivajo krmo z 1,1 mg lasalocida/kg, primerljivi z rezultati našega poskusa.



\*dnevi krmljenja z lasalocidom

**Slika 28:** Prikaz koncentracije lasalocida na folikel izražene v povprečnih vrednostih in mediani, po posameznih dnevih poskusa, med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (1,1 mg/kg).

**Figure 28:** The concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) of lasalocid in the follicle, expressed in average and median values, on the individual days of the experiment, during the treatment period and the depletion period after feeding with feed, containing lasalocid (1.1 mg/kg).

Iz slike 28 je razvidno hitro naraščanje lasalocida v jajčnih foliklih po začetku krmljenja, kar pomeni, da ko je zdravilo prisotno v krmi, se začne tudi nalagati tudi v jajčnih foliklih. Po šestem dnevu krmljenja vsebnost pade, naraste pa ponovno osmi dan poskusa, to je dan po prenehanju dajanja krme z lasalocidom. Po osmem dnevu se vsebnost lasalocida postopoma znižuje. Dinamiko nalaganja v foliklih lahko razložimo/povežemo s fiziologijo nastajanja jajca, kjer je v zaključni fazi jajčnega folikla, ki traja od 7 do 10 dni, značilna intenzivna tvorba rumenjaka v foliklih (Kan, 2003; Vandenberghe in sod., 2012)

#### 4.4 REZULTATI ANALIZIRANIH VZORCEV IZTREBKOV

Rezultate za analizirane vzorce iztrebkov za vse tri koncentracije lasalocida v krmi kokoši nesnic prikazujemo v preglednici 42.

**Preglednica 42:** Povprečne vrednosti lasalocida v vzorcih iztrebkov kokoši nesnic pri vseh poskusih, izražene v  $\mu\text{g}/\text{kg}$  suhe snovi.

**Table 42:** The average values of lasalocid in the faeces of laying hens in all experiments, expressed in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of dry matter.

Dan poskusa	Koncentracija lasalocida v krmi v mg/kg		
	5,7	3,2	1,1
1*	135,00	456,70	2,58
2*	496,70	173,00	2,54
3*	485,00	230,00	2,52
4*	915,00	370,00	2,52
5*	1120,00	110,00	2,55
6*	1200,00	255,00	2,52
7*	1300,00	880,00	2,52
8	130,00	115,00	2,56
9	< 2,5	60,00	2,54
10	< 2,5	45,00	2,53
11	< 2,5	< 2,5	2,54
12	< 2,5	< 2,5	2,57

\*dnevi krmljenja z lasalocidom

Pri vseh treh poskusih analiziranih vzorcev iztrebkov smo ugotovili, da se je lasalocid v iztrebkih kokoši pojavil že prvi dan krmljenja (preglednica 42). Pri koncentraciji 5,7 mg/kg in 3,2 mg/kg je vsebnost lasalocida v iztrebkih naraščala do sedmega dne in po prenehanju dajanja krme z lasalocidom izredno hitro padla. Lasalocid smo v iztrebkih zadnjič ugotovili osmi dan (pri 5,7 mg/kg) in deseti dan (pri 3,2 mg/kg). Po tem so bile vse analizirane vsebnosti pri obeh koncentracijah pod mejo zaznavnosti < 2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Pri koncentraciji lasalocida (1,1 mg/kg) krme pa so bile vsebnosti lasalocida v analiziranih vzorcih iztrebkov vse dni poskusa približno na enaki ravni (in sicer 2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). V preglednici 42 prikazujemo rezultate do dvanajstega dne poskusa, čeprav smo pri koncentraciji 5,7 in 3,2 mg lasalocida/kg krme analize opravljali do enaindvajsetega dne poskusa; vendar so bile ugotovljene vsebnosti po dvanajstem dnevu pod mejo zaznavnosti (< 2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Sklepamo, da je visoka povprečna vrednost analiziranega vzorca iztrebka prvi dan poskusa pri koncentraciji lasalocida v krmi (3,2 mg/kg) lahko posledica zaužitja večje količine krme pri kokoših.

## 5. RAZPRAVA

Skozi leta se je izkazalo, da intenzivna perutninska proizvodnja brez uporabe kokcidiostatikov v terapevtske in preventivne namene praktično ni več mogoča. Med njimi se je kljub terapevtski učinkovitosti in predpisani karenci kot posebno problematičen pokazal ionoforni kokcidiostatik lasalocid, ki ga je zelo težko odstraniti iz mešalcev in proizvodnih poti v mešalnicah krmil. Lasalocid je v skladu z Uredbo Komisije št. 1831/2003 registriran kot dovoljen krmni dodatek za preprečevanje kokcidioze za piščance in purane. Krmil se konstantno dodaja vsak dan v količini od 75 mg/kg do 125 mg/kg od prvega dne do največ pet dni pred klanjem živali. Zaradi varovanja zdravja ljudi so za perutnino (piščance in purane) določene vrednosti MRL za živila, ki se uporabljajo za prehrano ljudi (Izvedbena Uredba Komisije št. 1277/2014). Njegovo nalaganje/zaostajanje v proizvodnih poteh ima za posledico navzkrižno kontaminacijo krme za neciljne živali (kokoši nesnice), saj zanje kot krmni dodatek ni dovoljen. Posledica pojavljanja lasalocida v jajcih kokoši nesnic, kjer ga ne bi smelo biti, je bila določitev vrednosti MRL za jajca.

Zaradi neizbežne navzkrižne kontaminacije v proizvodnem procesu priprave krmil, so določene tudi vrednosti MRL za živila, ki izhajajo od neciljnih živali (Uredba Komisije št. 124/2009, Izvedbena Uredba Komisije št. 86/2012 in Uredba Komisije št. 610/2012), prav tako so zakonsko določene tudi mejne vrednosti kokcidiostatikov v krmi za neciljne živali, kot posledica neizogibnega prenosa (Direktiva Komisije, št. 2009/8). Direktiva določa, da so še sprejemljive vsebnosti tiste koncentracije, ki pomenijo 1 % najvišjih predpisanih vsebnosti kokcidiostatika (kot krmnega dodatka), kar je v primeru lasalocida 1,25 mg/kg krme.

Ostanki kokcidiostatikov in njihovi razgradni produkti pridejo v okolje z izločki živali, zato jih lahko uporabljamo kot sledila in indikatorje kmetijskega onesnaženja. Na koncentracijo spojin v okolju vplivajo poleg izvirne koncentracije kokcidiostatika v krmi tudi vrste tal. Razgradnja pa je odvisna od kemijskih lastnosti kokcidiostatika in lastnosti okolja, v katerem se kokcidiostatik nahaja (temperatura, vlaga, pH-vrednost in vsebnost organskih spojin) (EFSA, 2004; Hansen in sod., 2009; Koroša in sod., 2014).

Zaradi vsega naštetega smo v naših poskusih kokoši nesnice krmili s krmo, ki smo ji dodali znane količine lasalocida. Količine dodanega lasalocida so predstavljale polovične vrednosti, ki jih je v svoji študiji uporabila Evropska agencija za varnost hrane pri pripravi analize tveganja za zdravje ljudi. Pri analizi tveganja so upoštevali, da izvirajo živila od neciljnih živali, ki so s

krmo prejemale 10 %, 5 %, in 2 % (kar ustreza 12,5; 6,25 in 2,5 mg) lasalocida na kg krme, glede na najvišje predpisane doze kokcidostatika kot dovoljenega krmnega dodatka za piščance in purane (125 mg/kg krme). Kokoši nesnice v naših poskusih so s krmo sedem dni dobivale 5,7; 3,2 in 1,1 mg lasalocida na kg krme, kar ustreza 4,6 %, 2,6 % in 0,9 % (glede na najvišje predpisane vsebnosti lasalocida). V analiziranih tkivih, rumenjaki in jajčnih folikli smo proučili dinamiko pojavljanja in izginjanja lasalocida med in po prenehanju dajanja krme z lasalocidom. Še posebej nas je zanimala najnižja koncentracija lasalocida v krmi, ki je blizu dovoljene vsebnosti, ki naj ne bi povzročala prekomernih zaostankov v živilih živalskega izvora, še zlasti ne v jajcih. Pri vseh poskusih smo proučili tudi dinamiko pojavljanja in izginjanja lasalocida v iztrebkih kokoši nesnic.

Pri najvišji koncentraciji lasalocida v krmi 5,7 mg/kg smo analizirali: jetra, ledvice, mišično tkivo, abdominalno maščobo, kožo z maščobo, beljake, rumenjake in jajčne folikle. Vsebnost lasalocida v tkivih smo spremljali od zadnjega dne krmljenja z lasalocidom (po sedem dnevnem dajanju le-tega) dalje. Pri skupno preiskanih 24 vzorcih jeter kokoši nesnic je bila vsebnost lasalocida v vseh vzorcih pričakovano najvišja sedmi dan (to je zadnji dan krmljenja z lasalocidom). V vseh vzorcih jeter so vsebnosti lasalocida presegale vrednost MRL za neciljne živali, to je 50 µg/kg. V nobenem vzorcu jeter pa nismo našli več, kot je vrednost MRL za jetra pri perutnini (300 µg/kg). Vsebnosti lasalocida v jetrih so se izrazito zmanjšale že drugi dan po prenehanju dajanja lasalocida, to je deveti dan poskusa; kljub temu smo ga v jetrih našli še osmi dan po prenehanju dajanja krme (11 µg/kg), ki je vsebovala lasalocid (preglednica 12).

Do podobnih rezultatov so prišli v študiji, kjer so bile sicer uporabljene terapevtske koncentracije lasalocida (125 mg/kg). Lasalocid so v jetrih ugotovili še peti dan po prenehanju dajanja, kar nekateri avtorji povezujejo z vgradnjo lasalocida v endogene substance jeter (Lehel in sod., 1995; EFSA, 2004). Naši rezultati potrjujejo predhodne ugotovitve raziskovalcev, da so jetra poleg rumenjakov najpogostejše tkivo, kjer se nalaga lasalocid (Kennedy in sod., 1995; EFSA, 2007). Tudi rezultati monitoringa na kokcidostatike kažejo, da najdemo največ lasalocida v jajcih in jetrih perutnine (EFSA, 2007; Šinigoj in sod., 2010).

Pri vseh preiskovanih vzorcih ledvic smo lasalocid ugotovili sedmi dan poskusa (to je zadnji dan krmljenja z lasalocidom). V vseh vzorcih ledvic odvzetih na sedmi dan krmljenja z lasalocidom, so vsebnosti presegale vrednosti MRL za ledvice (20 µg/kg) za neciljne živali, niso pa presegale vrednosti MRL za perutnino (150 µg/kg). Pri dveh preiskovanih vzorcih

ledvic smo lasalocid ugotovili še deveti dan poskusa, to je dva dni po prenehanju dajanja lasalocida (10 µg/kg in 7 µg/kg) in v enem vzorcu petnajsti dan poskusa, to je osem dni po prenehanju dajanja krme z lasalocidom (9 µg/kg). Najvišja ugotovljena vsebnost lasalocida v ledvicah je bila 90 µg/kg in je bila pričakovano ugotovljena sedmi dan krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (preglednica 13, preglednica 43).

V literaturi obstaja malo podatkov o vsebnosti lasalocida v ledvicah, saj ledvice niso ciljno tkivo za njegovo nalaganje; prav tako nismo zasledili podatkov o ostankih lasalocida v ledvicah kokoši nesnic. Pri študijah metabolizma lasalocida pri piščancih in puranih so bile v poskusih uporabljene terapevtske doze. Lasalocid so v ledvicah ugotovili še pet dni po prenehanju dajanja (EFSA, 2004; EFSA, 2007). Rezultati zaostankov lasalocida v ledvicah kokoši nesnic so novost. Dinamika nalaganja in izginjanja lasalocida iz tkiva pa je podobna kot pri piščancih in puranih.

Iz rezultatov analiziranih vzorcev mišičnega tkiva kokoši nesnic ugotavljamo, da so vsebnosti lasalocida zelo nizke, saj je bila povprečna vrednost lasalocida v mišičnem tkivu zadnji dan dajanja 0,3 µg/kg. Najvišja ugotovljena vsebnost lasalocida v tkivu je bila 0,5 µg/kg. Pri nobenem vzorcu ni bila presežena vrednost MRL tako za neciljne živali (5 µg/kg) kot tudi za perutnino (60 µg/kg) (preglednica 43).

Eksperimentalni podatki o vsebnosti lasalocida v mišičnem tkivu perutnine so redki, prav tako nismo zasledili podatkov o vsebnosti lasalocida v mišičnem tkivu kokoši nesnic.

Naši rezultati so primerljivi z rezultati študije, ki jih navaja EFSA. Piščanci so s krmo dobivali radioaktivno označen lasalocid v koncentraciji 125 mg/kg krme. Lasalocida v mišičnem tkivu niso ugotovili že prvi dan po prenehanju dajanja medicirane krme (EFSA, 2004). Rezultati podobne študije iz Belgije, pri kateri so piščanci dobivali s krmo 6,25 mg lasalocida pa kažejo, da so najvišjo vrednost lasalocida ugotovili peti dan po začetku krmljenja. Vrednosti pa so se zmanjšale pod mejo vrednotenja peti dan po prenehanju dajanja takšne krme (Vandenberge in sod., 2012). Podatki monitoringov prav tako kažejo, da lasalocid redko najdejo v mišičnem tkivu perutnine. V študiji iz Švice so lasalocid ugotovili v dveh od 48 vzorcev perutninskega mesa v vsebnosti 30,5 in 4,1 µg/kg (Noser in sod., 2006). V Nemčiji so lasalocid nazadnje ugotovili leta 2008 pri dveh vzorcih perutninskega mesa (34 in 36 µg/kg) (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2008).

Pri analiziranih vzorcih kože z maščobo od 24 kokoši nesnic noben vzorec ni presegal vrednosti MRL za perutnino. Najvišja ugotovljena vsebnost lasalocida je bila 119 µg/kg sedmi dan poskusa. Lasalocid smo v tkivu ugotovili še zadnji dan poskusa, to je štirinajst dni po prenehanju dajanja krme, ki je vsebovala lasalocid. Rezultati kažejo, da njegova vsebnost po prenehanju dajanja krme z lasalocidom hitro pade. Vsebnosti v abdominalni maščobi so zelo nizke in ne predstavljajo tveganja za zdravje ljudi. Kljub temu pa smo lasalocid v abdominalni maščobi ugotovili še zadnji 21 dan poskusa, to je kar štirinajst dni po prenehanju krmljenja z lasalocidom. Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da se lasalocid zelo počasi izloča iz abdominalne maščobe in ga v tkivu najdemo v sledovih še dolgo po prenehanju dajanja krme, ki je vsebovala lasalocid (5,7mg/kg), vendar so njegove vsebnosti od devetega dne (dva dni po prenehanju dajanja krme) do zadnjega dne poskusa praktično nespremenjene. V literaturi nismo zasledili eksperimentalnih podatkov o vsebnosti lasalocida v abdominalni maščobi kokoši nesnic (preglednica 43).

Vsebnosti lasalocida v koži z maščobo so podobne kot v abdominalni maščobi. Za oboje je značilno naraščanje vsebnosti lasalocida v tkivu v času, ko je krma vsebovala lasalocid, zaznaven padec vsebnosti lasalocida po prenehanju krmljenja ter dolga prisotnost nizkih vsebnosti v tkivu po prenehanju dajanja krme z lasalocidom. Rezultati so primerljivi z redkimi podatki iz literature (EFSA, 2004; 2007) o vsebnosti lasalocida v maščobi perutnine, kjer so ga pri piščancih in puranih ugotovili še peti dan po prenehanju dajanja medicirane krme (125 mg/kg), vendar so v poskusu uporabili višje koncentracije lasalocida v krmi. Pri piščancih krmljenih s krmo, ki je vsebovala 125 mg lasalocida/kg, so v koži z maščobo ugotovili 40 µg/kg lasalocida. Pri puranih je bila pri koncentraciji v krmi 200 mg lasalocida/kg, vsebnost lasalocida v koži z maščobo 120 µg/kg (EFSA, 2004; 2007).

Dobljeni rezultati so novost, ker prikazujejo celotno sliko farmakodinamike lasalocida v tkivih kokoši nesnic.

**Preglednica 43:** Poskus krmljenja kokoši s 5,7 mg lasalocida/kg krme; vrednosti lasalocida v različnih tkivih zadnji dan poskusa krmljenja (7. dan poskusa) in po prenehanju dajanja lasalocida, podane so najnižje in najvišje koncentracije v  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

**Table 43:** Experiment: feeding laying hens with 5.7 mg of lasalocid/kg feed; the concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) of lasalocid in different tissues last day feeding of experiment (on the seventh day of the experiment) and after the depletion period; the minimum and maximum values.

Dan poskusa	7. dan *	9. dan	11. dan	13. dan	15. dan	21. dan
Jetra	101–282	< 5–8	< 5	< 5	< 5–11	< 5
Ledvice	32–90	< 1–10	< 1	< 1	< 1–9	
Koža z maščobo	55–117	33–31	31	30	30	31
Abdominalna maščoba	16–119	< 1–65	< 1	< 1	< 1	< 1
Mišično tkivo	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

\*zadnji dan krmljenja z lasalocidom

V beljaku smo lasalocid ugotovili od drugega dne dajanja in še dva dni po prenehanju dajanja krme, ki je vsebovala lasalocid. Beljak je vseboval zelo nizke vsebnosti lasalocida, in sicer po šestih dneh dajanja povprečno  $2,4 \mu\text{g}/\text{kg}$ , na sedmi dan poskusa (to je zadnji dan krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid)  $1,7 \mu\text{g}/\text{kg}$  in osmi dan poskusa (prvi dan po prenehanju krmljenja z lasalocidom)  $1,9 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Najvišja ugotovljena vsebnost lasalocida v beljaku je bila  $3,0 \mu\text{g}/\text{kg}$ , šesti dan dajanja krme z lasalocidom. Nizke vsebnosti lasalocida v beljaku pri koncentraciji  $5,7 \text{ mg}/\text{kg}$  le-tega v krmi, so povsem primerljive z ugotovitvami, ki jih v svojih raziskavah navajajo drugi raziskovalci (Kennedy in sod., 1996, EMA, 2006 in Vandenberghe in sod., 2012). Tudi pri naših raziskavah smo ugotovili, da se lasalocid nalaga v jajčnem rumenjaku, medtem ko ga je v beljaku zelo malo. Zaradi nizkih ugotovljenih vsebnosti lasalocida v beljaku pri koncentraciji le-tega v krmi  $5,7 \text{ mg}/\text{kg}$  krme, ga v nadaljevanju poskusa pri koncentracijah lasalocida v krmi  $3,2$  in  $1,1 \text{ mg}/\text{kg}$ , nismo več ugotavljali.

V vzorcih rumenjakov smo lasalocid ugotavljali vseh enaindvajset dni trajanja poskusa. Skupno smo analizirali 110 vzorcev. Lasalocid smo v rumenjaku prvič ugotovili že drugi dan krmljenja pri treh vzorcih (od šestih analiziranih); vsebnosti so bile  $8 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $12 \mu\text{g}/\text{kg}$  in  $18 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

Vrednosti v jajčnih rumenjaki smo primerjali z vrednostjo MRL za jajca ( $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), ker se jajčni rumenjaki pogosto uporabljajo kot samostojno živilo. Vrednost MRL za jajca je bila prvič



presežena pri enem vzorcu že tretji dan poskusa, rumenjaki je vseboval 151  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Četrty dan poskusa smo vrednosti nad MRL ugotovili pri treh od šestih vzorcih (155, 197 in 224  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), enako tudi peti dan poskusa (182, 187 in 192  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Šesti in sedmi dan poskusa (zadnji dan krmljenja z lasalocidom) smo pri vseh analiziranih vzorcih ugotovili vsebnost lasalocida nad vrednostjo MRL. Povprečni vrednosti sta bili 332  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in 401,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Po prenehanju dajanja krme z lasalocidom smo v rumenjakih še pet dni po prenehanju dajanja lasalocida ugotovili povprečne vsebnosti lasalocida, ki so bile višje od vrednosti MRL za jajca (428,5; 449,2; 352,2; 220,0 in 226,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Ker smo v naši raziskavi opravljali analize rumenjaka in ne celega jajca, smo dobljene vsebnosti lasalocida preračunali na celo jajce. Pri preračunavanju smo upoštevali, da so jajca težka 60 g. Pri najvišji ugotovljeni vsebnosti lasalocida v rumenjaku (617  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) smo na opisan način preračunali, da bi bila vsebnost lasalocida v celem jajcu 226  $\mu\text{g}/\text{kg}$  lasalocida, pri najvišji povprečni vsebnosti lasalocida v rumenjaku (449,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) pa 164  $\mu\text{g}/\text{kg}$  lasalocida v celem jajcu. V obeh primerih koncentraciji presegata vrednost MRL (150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Z namenom ugotoviti, kaj to pomeni glede na ADI za lasalocid, smo dobljene vrednosti lasalocida za celo jajce preračunali tudi na ADI za lasalocid (5,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  t.m./dan, upošteva se 60 kg težak potrošnik). Ugotovili smo, da bi pri najvišji ugotovljeni vsebnosti lasalocida v celem jajcu (226  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) v enem obroku jajc prejeli 59,47  $\mu\text{g}$  lasalocida, pri najvišji povprečni vsebnosti v jajcu (164  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) pa 43,21  $\mu\text{g}$ . Obe vrednosti sta pod dovoljenim dnevnim vnosom, če potrošnik zaužije 100 g jajc v obroku. Pri uživanju večjega števila jajc naenkrat (ali v enem obroku), pa lahko prihaja do tveganja za zdravje ljudi.

Rezultati našega poskusa so pokazali, da so bile računsko določene vsebnosti lasalocida v jajcih pri znani koncentraciji le-tega v krmi, ob upoštevanju najvišje ugotovljene in povprečne vsebnosti v rumenjaku, preračunane na celo jajce, nižje od vsebnosti, ki jih dobimo ob uporabi Kennedyjeve enačbe.

Če rezultate primerjamo z rezultati Kennedyja in sodelavcev (1996), kjer so kokoši s krmo dobivale lasalocid v koncentraciji 5,0 mg/kg, kar je nekoliko manj kot pri našem poskusu, analize pa so opravljali na celem jajcu, so lasalocid ugotovili že prvi dan po dajanju krme. Vsebnosti lasalocida v jajcih so naraščale do sedmega dne, ko so ugotovili najvišjo vrednost 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Lasalocida v jajcih pa ni bilo več deseti dan po prenehanju dajanja s krmo. V našem poskusu smo lasalocid v jajčnem rumenjaku prvič ugotovili drugi dan krmljenja, vrednosti so

naraščale do devetega dne, vrednosti nad MRL za jajca smo ugotovili še šest dni po prenehanju dajanja krme z lasalocidom. Lasalocid v rumenjaku pa smo ugotovili še štirinajsti dan po prenehanju dajanja krme.

Dokazali smo tudi, da obstaja statistično značilna razlika v vsebnosti lasalocida v jajčnem rumenjaku po posameznih dnevih (Kruskal–Wallis H test;  $\chi^2(11) = 49,097$ ,  $p = 0,000$ ). Ugotovili smo, da načeloma med zaporednimi dnevi poskusa (npr. med tretjim in četrtem) ni statistično značilnih razlik, statistično značilne razlike pa ugotavljamo med ključnimi mejniki opazovanja, npr. med tretjim in sedmim dnem, (Mann–Whitney test:  $U = 0,000$ ;  $P = 0,004$ ;  $AS(3) = 73,8333$ ,  $Me(3) = 64,00$ ,  $AS(7) = 410,66$ ,  $Me(7) = 408,50$ ); med petim in šestim dnem ( $U = 1,000$ ;  $P = 0,006$ ;  $AS(5) = 137,66$ ,  $Me(5) = 144,00$ ,  $AS(6) = 332,00$ ,  $Me(6) = 355,00$ ); med sedmim in štirinajstim dnem ( $U = 0,000$ ,  $P = 0,004$ ;  $AS(7) = 410,66$ ,  $Me(7) = 408,50$ ,  $AS(14) = 51$ ,  $Me(14) = 35,00$ ) (preglednica 20).

V študiji, ki so jo opravili Vandenberghe in sodelavci (2012), so kokoši dobivale krmo s 6,25 mg/kg lasalocida, kar ustreza 5 % vrednosti najvišje terapevtske doze za perutnino. Pri analiziranih vzorcih celega jajca so najvišje vrednosti lasalocida ugotovili sedmi dan dajanja krme z lasalocidom, kar se ujema tudi z našimi rezultati. Avtorji tudi navajajo, da so v rumenjaku ugotovili približno trikrat višje vrednosti lasalocida, kot v celem jajcu, kar potrjujejo tudi naši izračuni. Zaradi vseh teh ugotovitev priporočamo, da je potrebno rumenjak obravnavati kot samostojno živilo.

Pri analizi jajčnih foliklov smo preverili, ali je masa folikla povezana z vsebnostjo lasalocida. Rezultati analiziranih jajčnih foliklov potrjujejo naše domneve, da v njih najdemo lasalocid, če je le-ta prisoten v krmi, saj se zdravilo akumulira v foliklih in od tu ne prehaja več v druga tkiva. Ugotovili smo tudi, da večji folikli, ki so starejši in so rasli dalj časa, vsebujejo tudi več lasalocida, kar smo dokazali s statistično značilno pozitivno povezavo med maso folikla in vsebnostjo lasalocida v njem (Spearmanov koeficient je vedno večji od 0,8 povezanost je statistično značilna pri  $p < 0,01$ ). Ugotovili smo tudi, da med kokošmi v poskusu ne obstajajo statistično značilne razlike v koncentraciji lasalocida na folikel (Kruskal–Wallis test,  $\chi^2(5) = 10,018$ ;  $p = 0,075$ ), zato lahko na podlagi dobljenih rezultatov pričakujemo, da se bodo v jajčnih foliklih pri koncentraciji lasalocida v krmi (5,7 mg/kg), pojavljale primerljive vsebnosti lasalocida.

Rezultati in ugotovitve o vsebnostih lasalocida v jajčnih foliklih kokoši nesnic so novost in jih velja upoštevati pri uporabi jajčnih foliklov kot samostojnega živila, saj le-ti v mnogih deželah veljajo za delikateso.

V literaturi nismo zasledili podatkov o vsebnosti lasalocida v jajčnih foliklih kokoši. Rezultati potrjujejo tezo, da se lasalocid nalaga v rumenjaku, saj so njegove vsebnosti v vseh analiziranih foliklih sedmi dan poskusa, zelo visoke (AS 1693,28 ; Me 175,50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , (preglednica 22).

V drugem poskusu (koncentracija lasalocida v krmi 3,2 mg/kg) smo analizirali jetra, ledvice, kožo z maščobo, rumenjake in jajčne folikle. Vsebnost lasalocida v tkivih smo spremljali od prvega dne poskusa dalje.

Lasalocid smo v enem vzorcu jeter od skupno pregledanih dveh vzorcih prvič ugotovili že prvi dan dajanja krme (19  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), prav tako smo ga pri enem vzorcu ugotovili tudi drugi dan (45  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Tretji in četrti dan smo lasalocid ugotovili v vseh preiskovanih vzorcih. Vsebnosti tretji dan so bile 28  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in 56  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in četrti dan 44  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in 14  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (preglednica 23). Vrednost MRL za jetra za neciljne živali (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) je bila presežena pri šestih vzorcih analiziranih jeter, pri enem vzorcu je bila 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; medtem ko vrednosti MRL za perutnino (300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) niso bile presežene pri nobenem analiziranem vzorcu jeter kokoši nesnic. Lasalocid smo pri enem vzorcu ugotovili še tri dni po prenehanju dajanja krme z lasalocidom, njegova vrednost je bila nizka (18  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Rezultati poskusa kažejo značilno dinamiko pojavljanja lasalocida v jetrih, to je njegovo hitro pojavljanje že prvi dan krmljenja, naraščanje do sedmega dne in hiter padec koncentracije v tkivu po prenehanju dajanja krme z lasalocidom. Naši rezultati dokazujejo, da tudi nizke koncentracije lasalocida v krmi povzročajo njegovo nalaganje v tkivih. Ob primerjavi teh rezultatov z rezultati našega predhodnega poskusa z vsebnostjo lasalocida v krmi (5,7 mg/kg) ugotavljamo podobno dinamiko pojavljanja in izločanja lasalocida. Najvišje vsebnosti so bile ugotovljene šesti dan dajanja krme z lasalocidom. Štiri dni po prenehanju krmljenja z lasalocidom pri koncentraciji 3,2 mg/kg ga v jetrih nismo več ugotovili, medtem ko smo ga pri koncentraciji 5,7 mg/kg krme v jetrih našli še osem dni po prenehanju dajanja krme z lasalocidom.

Od skupno 27 preiskanih vzorcev ledvic kokoši nesnic je bila vrednost MRL za neciljne živali (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) presežena pri devetih vzorcih, medtem ko vrednost MRL za perutnino (150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ni bila presežena pri nobenem analiziranem vzorcu. Najvišjo vsebnost lasalocida v ledvicah

smo ugotovili šesti dan krmljenja, bila je 66 µg/kg. Iz rezultatov je razvidno, da ledvice sicer ne predstavljajo ciljnega organa za nalaganje lasalocida, ugotovili pa smo njegove ostanke nad vrednostjo MRL za neciljne živali, kar je nova ugotovitev in jo je potrebno upoštevati pri uporabi tkiva v živilski industriji, ker se trupi kokoši nesnic (vključno z ledvicami) uporabljajo v predelavi (mehanično izkoščeno meso, paštete, jušne kocke ...) ali pa se prodajajo pakirani, skupaj z zelenjavo.

Tudi pri koncentraciji lasalocida 3,2 mg/kg krme smo v koži z maščobo ugotovili nizke vsebnosti lasalocida. Najvišjo povprečno vsebnost 35 µg/kg smo ugotovili šesti dan poskusa. Vrednost MRL za kožo z maščobo (300 µg/kg) ni bila presežena pri nobenem vzorcu. Zaključimo lahko, da so ostanki lasalocida v koži z maščobo pri koncentraciji le-tega v krmi 3,2 mg/kg zelo nizki.

Lasalocid smo v rumenjakih prvič ugotovili že tretji dan krmljenja kokoši s krmo, ki je vsebovala 3,2 mg lasalocida/kg. Ugotovljene vrednosti so bile 19 µg/kg, 20 µg/kg, 28 µg/kg in 60 µg/kg. Sedmi (zadnji) dan krmljenja so vsebnosti lasalocida v rumenjakih prvič presegle vrednosti MRL za jajca (166 µg/kg in 155 µg/kg). Največ lasalocida v rumenjaku (478 µg/kg) smo ugotovili deveti dan poskusa, to je dva dni po prenehanju dajanja krme, ki je vsebovala lasalocid.

Po prenehanju dajanja krme z lasalocidom smo v rumenjaku še štiri dni po prenehanju (enajsti dan poskusa) ugotovili povprečne vsebnosti lasalocida, ki so bile višje od vrednosti MRL za jajca (181 µg/kg). Lasalocid smo v rumenjakih ugotovili še peti dan po prenehanju dajanja krme, ki je vsebovala lasalocid (to je dvanajsti dan poskusa), vendar vsebnosti niso presegale vrednosti MRL za jajca. Bile so 52 µg/kg, 76 µg/kg in 94 µg/kg. S Kruskal–Wallis H testom smo dokazali, da obstaja statistično značilna razlika v vsebnosti lasalocida v jajčnem rumenjaku po posameznih dnevih ( $\chi^2(6) = 31,639$ ,  $p = 0,000$ ). Prav tako lahko potrdimo, da obstaja statistično značilna razlika med ključnimi mejniki opazovanja (tretjim, sedmim, petim, devetim in desetim dnem, Mann–Whitney test;  $U = 0,000$ ;  $P = 0,004$ ;  $AS(3) = 21,17$ ,  $Me = 19,50$ ;  $AS(7) = 125,50$ ;  $Me(7) = 130,50$ ;  $U = 0,000$ ;  $P = 0,004$ ;  $AS(5) = 69,00$ ;  $Me(5) = 78,50$ ;  $AS(9) = 229,33$ ;  $Me(9) = 191,00$  in  $U = 6,000$ ;  $P = 0,055$ ;  $AS(6) = 91,67$ ;  $Me(6) = 107,00$ ;  $AS(10) = 170,33$ ;  $Me(10) = 193,00$ ) (preglednica 26).

Pri preverjanju Kennedyjevega izračuna smo ugotovili, da bi bile pri koncentraciji 3,2 mg/kg lasalocida v krmi pričakovane vsebnosti lasalocida v jajcih 203,5 µg/kg, kar je še vedno več,

kot je vrednost MRL za jajca. Če naše podatke o količini lasalocida v rumenjakih preračunamo na celo jajce, dobimo pri najvišji ugotovljeni vsebnosti lasalocida (478 µg/kg) pričakovano vsebnost v jajcu 175 µg/kg, pri najvišji povprečni vsebnosti lasalocida v rumenjaku (229 µg/kg), pa dobimo koncentracijo v celem jajcu 83,4 µg/kg.

Ob upoštevanju preračuna najvišje ugotovljene vsebnosti lasalocida na celo jajce (175 µg/kg), z ADI, bi v enem obroku jajc prejeli 33,9 µg. Pri povprečni vsebnosti v jajcih (83,4 µg/kg) pa 11,66 µg. Obe vrednosti sta nižji od dovoljenega dnevnega vnosa.

Naši rezultati so primerljivi z rezultati Kennedyja in sodelavcev (1996), ki so pri vsebnosti lasalocida v krmi pri koncentraciji 2,5 mg/kg krme v jajcih ugotovili zaostanke lasalocida v koncentraciji 160 µg/kg, kar lahko potrdimo tudi z našim izračunom vsebnosti lasalocida za celo jajce.

Rezultati Vandenbergove in sodelavcev (2012) pri poskusu s krmo, ki je vsebovala 2,5 % koncentracijo lasalocida glede na predpisano terapevtsko dozo (vsebnost lasalocida v krmi je bila 3,35 mg/kg krme) za celo jajce, kažejo, da so najvišje vsebnosti lasalocida ugotovili sedmi dan poskusa. Vrednosti nad MRL pa so ugotovili še štiri dni po prenehanju dajanja krme z lasalocidom.

Rezultati raziskave prav tako potrjujejo navedbe drugih raziskovalcev, da so najvišje vsebnosti lasalocida v jajcih dosežene med sedmim in devetim dnem dajanja krme, ki vsebuje lasalocid (Rokka in sod., 2005, Vandenberg in sod., 2012).

V preglednici 44 prikazujemo povprečne vsebnosti lasalocida v tkivih nesnic, kjer je razvidno naraščanje lasalocida v preiskovanih vzorcih v času krmljenja in hiter padec po prenehanju dajanja krme z lasalocidom.

**Preglednica 44:** Poskus krmljenja kokoši s 3,2 mg lasalocida/kg krme; povprečne vsebnosti lasalocida v različnih tkivih kokoši nesnic podane v  $\mu\text{g}/\text{kg}$  v času trajanja poskusa.

**Table 44:** Experiment: feeding laying hens with 3.2 mg of lasalocid/kg feed; the concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), expressed in average values of lasalocid in different tissues during the experiment.

Vrsta tkiva	Dan poskusa										
	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	9	10	11	12
Jetra	<10	22,5	42,0	29,0	108,0	136,5	70,2	< 10	< 10	< 10	< 10
Ledvice	< 5	7	22	13	28	51	22	< 5	< 5	< 5	< 5
Koža z maščobo	< 5	10	7	< 5	5	35	17	< 5	< 5	< 5	< 5

\*dnevi krmljenja z lasalocidom

V literaturi nismo zasledili podatkov o podobnih primerjalnih poskusih na različnih tkivih kokoši nesnic. Najpogosteje so raziskovali obnašanje/dinamiko lasalocida v jajcih in jajčnem rumenjaku. S primerjavo vsebnosti lasalocida v različnih tkivih pri znani koncentraciji v krmi tako dobimo celotno sliko o nalaganju in izločanju lasalocida v tkivih nesnic, kar je novost.

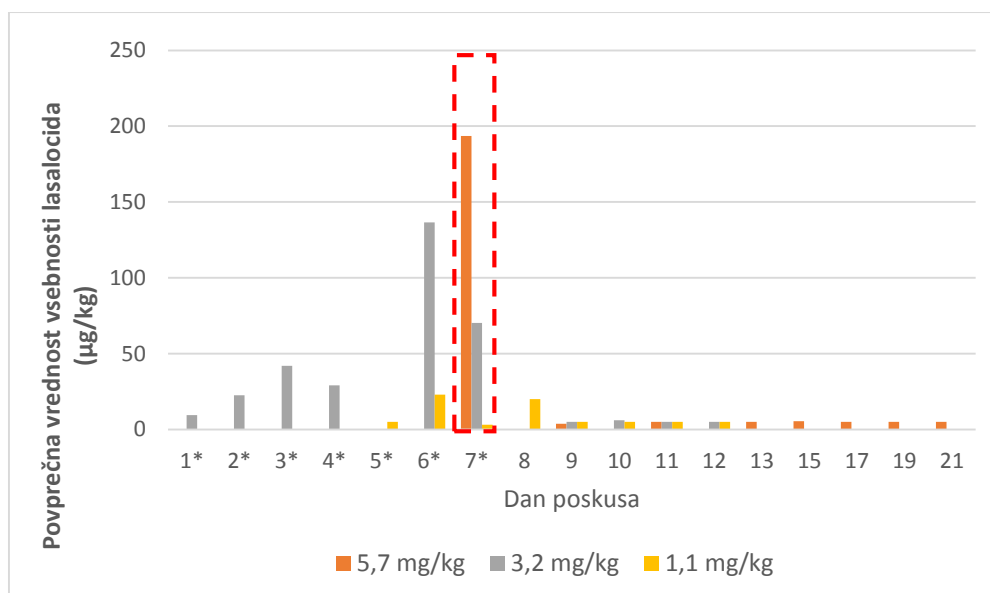
Prav tako v literaturi nismo zasledili podatkov o vsebnosti lasalocida v jajčnih foliklih kokoši. Rezultati potrjujejo tezo, da se lasalocid nalaga v rumenjaku, saj so njegove vsebnosti v vseh analiziranih foliklih pri koncentraciji lasalocida v krmi 3,2 mg/kg še vedno zelo visoke. Dokazali smo, da je povezava med maso folikla in vsebnostjo lasalocida statistično značilna, tako za posamezne kokoši kot za vse živali v poskusu (Spearmanov koeficient je vedno večji od 0,8 povezanost je statistično značilna pri  $p < 0,01$ ), kar je pomembno upoštevati s stališča uporabe jajčnih foliklov, kot samostojnega živila za prehrano ljudi. Dokazali smo tudi, da med posameznimi kokoši glede na dan krmljenja ne obstaja statistično značilna razlika med vsebnostjo lasalocida v foliklu, kar pomeni, da lahko z znano koncentracijo lasalocida v krmi pričakujemo pri vseh kokoših primerljive vsebnosti lasalocida v jajčnih foliklih (Kruskal-Wallis test ( $\chi^2(5) = 14,460$ ,  $p = 0,013$ ).

Rezultati Mann-Whitney testa so pokazali, da ni statistično značilnih razlik med kokošmi v poskusu, odstopa samo peta žival, kar lahko utemeljimo z zelo nizkimi ugotovljenimi vsebnostmi lasalocida na folikel (AS = 183; Me = 10,00) v primerjavi s povprečnimi vrednostmi vseh analiziranih foliklov (AS = 1892,92; Me = 199,50).

Pri najnižji koncentraciji lasalocida v krmi kokoši nesnic (1,1 mg/kg), smo analizirali: jetra, kožo z maščobo, rumenjake in jajčne folikle. Vsebnost lasalocida v tkivih smo spremljali od prvega dne poskusa naprej. Zaradi predhodno ugotovljenih nizkih vsebnosti lasalocida v ledvicah kokoši nesnic pri koncentraciji lasalocida v krmi 3,2 mg/kg analiz tkiva pri tem poskusu nismo več izvajali.

Rezultati poskusa dokazujejo, da vsebnosti lasalocida v jetrih kokoši nesnic pri koncentraciji le-tega v krmi 1,1 mg/kg ne presegajo vrednosti MRL za neciljne živali. Tudi če bi bila takšna koncentracija lasalocida v krmi vedno prisotna, kot posledica nenamerne navzkrižne kontaminacije krme v proizvodnem procesu, uživanje takšnih jeter ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi. Podatek je novost in je pomemben pri uporabi kokošjih jeter v živilski industriji (npr. za paštete).

Iz slike 29 je razvidno, da smo pri vseh preiskovanih koncentracijah v analiziranih vzorcih jeter ugotovili hitro pojavljanje lasalocida v tkivu v začetku krmljenja, njegovo naraščanje vseh sedem dni dajanja lasalocida ter hiter padec po prenehanju dajanja krme z lasalocidom.



\*dnevi krmljenja z lasalocidom

**Slika 29:** Prikaz povprečnih vrednosti lasalocida v jetrih kokoši nesnic, izraženih v µg/kg, pri vseh treh koncentracijah lasalocida v krmi (5,7; 3,2 in 1,1 mg/kg), med in po prenehanju krmljenja z lasalocidom.

**Figure 29:** The average values of the presence of lasalocid (µg/kg) in liver of laying hens during the treatment period and the depletion period after the feeding with feed of the three concentrations groups (5.7; 3.2 and 1.1 mg/kg).

Na podlagi dobljenih rezultatov ne moremo potrditi ugotovitev Vandenberghe in sodelavcev (2012), ki navajajo, da je lahko visoka koncentracija lasalocida v jetrih povezana tudi z visoko koncentracijo le-tega v celem jajcu.

V literaturi nismo zasledili podatkov o ostankih lasalocida v jetrih kokoši nesnic, zato so ti rezultati novost.

Prisotnost lasalocida v koži z maščobo smo ugotovili le v vzorcu odvzetem osmi dan poskusa (prvi dan po prenehanju dajanja lasalocida), bila je 28  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . V vseh ostalih dnevih lasalocida nismo določili ( $<10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), kar dokazuje, da koža z maščobo ni problematična s stališča nalaganja lasalocida pri tej koncentraciji v krmi.

Rezultati analiziranih vzorcev rumenjaka kažejo, da smo sedmi dan krmljena s krmo, ki je vsebovala 1,1 mg/kg lasalocida, v enem vzorcu ugotovili lasalocid nad vrednostjo MRL za jajca (265  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Še tri dni po prenehanju dajanja take krme je rumenjaki vseboval lasalocid nad MRL-vrednostjo. Največ lasalocida v rumenjaku (353  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) smo ugotovili deveti dan poskusa, to je dva dni po prenehanju dajanja krme, ki je vsebovala lasalocid.

Primerjava vsebnosti lasalocida v rumenjaku z vrednostjo MRL za jajca pri koncentraciji lasalocida v krmi 1,1 mg/kg je izredno pomembna tako s stališča uporabe rumenjaka kot samostojnega živila, kot tudi s stališča ostankov lasalocida v rumenjaku, ker je to tista koncentracija v krmi, ki naj ne bi povzročala prekomernih reziduov v jajcih.

Če analizirane podatke o količini lasalocida v rumenjaku preračunamo na celo jajce, ugotovimo, da dobimo pri najvišji ugotovljeni vsebnosti lasalocida v rumenjaku (353  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), izračunane koncentracije v jajcu 129  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , pri najvišji povprečni vsebnosti lasalocida v analiziranih rumenjakih (102  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) pa dobimo v jajcu koncentracijo lasalocida 37,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Preračunane vrednosti ne presegajo MRL vrednost za jajca.

Ob upoštevanju preračuna najvišje ugotovljene vsebnosti lasalocida na celo jajce (129  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), z ADI, bi v enem obroku jajc prejeli 33,9  $\mu\text{g}$  lasalocida. Pri povprečni vsebnosti v jajcih (37,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) pa 9,8  $\mu\text{g}$  lasalocida. Obe vrednosti sta nižji od dovoljenega dnevnega vnosa. Pri zaužitju večjega števila jajc naenkrat na dan (ali na obrok), pa lahko pride do povišanega vnosa lasalocida z jajci, kar lahko predstavlja tveganje za zdravje ljudi.

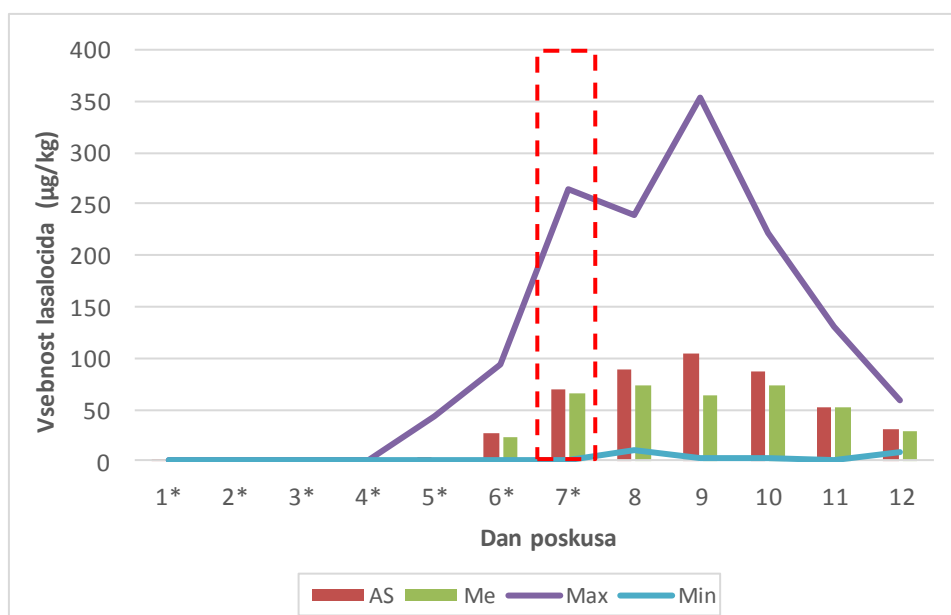


Rezultati so primerljivi z rezultati Kennedyja in sodelavcev (1996), ki so pri vsebnosti lasalocida v krmi pri koncentraciji 1,0 mg/kg v analiziranih vzorcih jajc ugotovili prisotnost lasalocida že prvi dan po pričetku krmljenja. Vsebnost lasalocida je naraščala in dosegla vrh po približno sedmih dneh krmljenja. Avtorji navajajo, da so tudi pri zelo nizki koncentraciji lasalocida v krmi (0,1 mg/kg), v jajcih še vedno ugotovili ostanke lasalocida v koncentraciji 6 do 8 µg/kg.

Pri preverjanju Kennedyjevega izračuna smo ugotovili, da bi bile pri koncentraciji 1,1 mg/kg lasalocida v krmi pričakovane vsebnosti lasalocida v jajcih okoli 70 µg/kg. Rezultati našega poskusa kažejo, da so bile ugotovljene vrednosti lasalocida v jajčnem rumenjaku bistveno višje. Pri preračunu najvišjih in povprečnih vsebnosti lasalocida v rumenjaku na celo jajce ugotovimo, da so pričakovane vsebnosti lasalocida v celem jajcu pod vrednostjo MRL, vendar niso zanemarljive in so primerljive s koncentracijo, ki jo dobimo z uporabo Kennedyjeve formule. Rezultati našega poskusa so novost. Pokazali so, da lahko pri uporabi krme, ki vsebuje zakonsko določeno mejno vrednost za lasalocid v krmi za neciljne živali (Direktiva Komisije št. 2009/8), vsebnosti lasalocida v rumenjakih presegajo vrednosti MRL za jajca. S praktičnim poskusom na kokoših nesnicah smo dokazali, da je lasalocid v rumenjaku prisoten, zato priporočamo, da bi bilo smiselno spremljati prisotnost lasalocida tudi ločeno v rumenjaku in ne samo v celem jajcu.

Rezultati poskusa so pokazali, da so se ostanki lasalocida prvič pojavili v jajčnem rumenjaku četrty dan krmljenja s krmo, ki je vsebovala 1,1 mg lasalocid/kg, sedmi dan pa so vsebnosti že presegale vrednosti MRL za jajca. Vsebnosti lasalocida, ki so močno presegale vrednosti MRL za jajca, pa smo v rumenjaku ugotovili še tri dni po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (slika 30). S Kruskal–Wallis H testom smo dokazali, da obstaja statistično značilna razlika v vsebnosti lasalocida v jajčnem rumenjaku po posameznih dnevih poskusa ( $\chi^2(11) = 95,476$ ;  $p = 0,000$ ).

Z Mann-Whitney testom smo preverili, med katerimi dnevi v poskusu obstaja statistično značilna razlika. Test je pokazal, da med zaporednimi dnevi v poskusu ni statistično značilne razlike, kar je pričakovano. Vrednosti lasalocida v rumenjakih so se postopoma zviševale, vendar je bila med njimi zelo majhna razlika, kar lahko pojasnimo z nizko koncentracijo lasalocida v krmi (1,1 mg/kg krme).



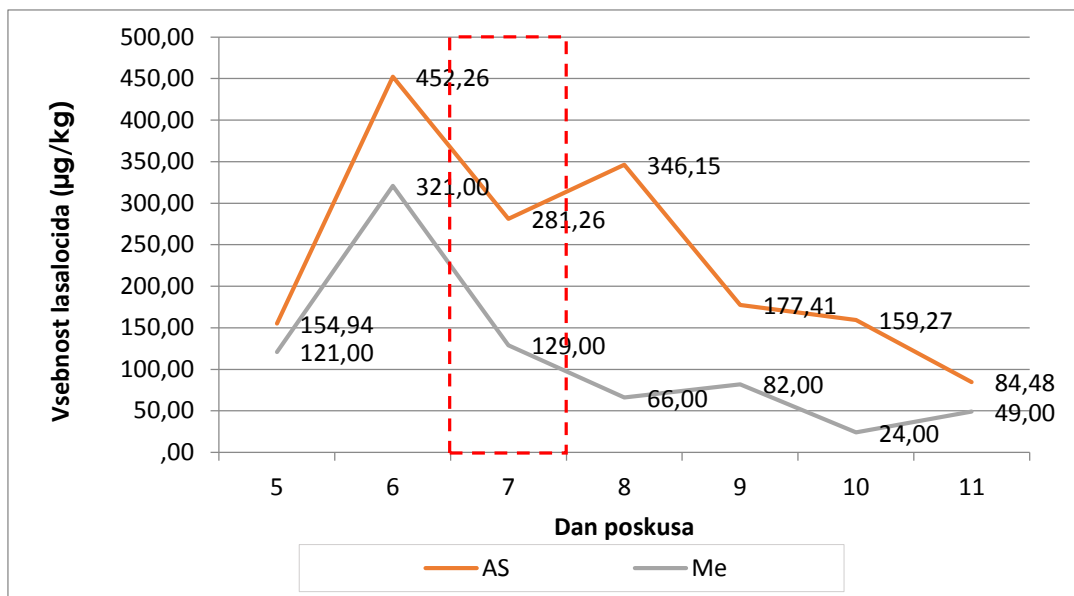
\*dnevi krmljenja z lasalocidom

**Slika 30:** Prikaz prisotnosti lasalocida v rumenjaki, med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid ( 1,1 mg/kg ).

**Figure 30:** The presence of lasalocid in egg yolk; during the treatment period and the depletion period after feeding with feed, containing lasalocid (1.1 mg/kg).

Pri statistični analizi jajčnih foliklov smo potrdili pozitivno povezanost med maso foliklov in koncentracijo lasalocida na folikel (Spearmanov koeficient vedno večji od 0,7; povezanost je statistično značilna pri  $p < 0,01$ ). Dokazali smo tudi, da obstaja statistično značilna razlika v koncentraciji lasalocida na folikel med posameznimi dnevi poskusa (Kruskal-Wallis test ( $\chi^2(6) = 17,224$ ,  $p = 0,008$ ). Z enakim testom, ki smo ga opravili za vsak posamezen dan poskusa, smo ugotovili tudi, da statistično značilna razlika v koncentraciji lasalocida na maso med kokošmi na posamezen dan poskusa ne obstaja (peti dan ( $\chi^2(4) = 2,063$ ,  $p = 0,724$ ; šesti dan ( $\chi^2(4) = 5,737$ ,  $p = 0,220$ ; sedmi dan ( $\chi^2(6) = 5,827$ ,  $p = 0,443$ ; osmi dan ( $\chi^2(6) = 4,227$ ,  $p = 0,646$ ; deveti dan ( $\chi^2(4) = 1,614$ ,  $p = 0,806$ ; deseti dan ( $\chi^2(4) = 5,730$ ,  $p = 0,220$  in enajsti dan ( $\chi^2(6) = 3,546$ ,  $p = 0,738$ ).

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da lahko pričakujemo pri koncentraciji lasalocida v krmi (1,1mg/kg), v jajčnih foliklih primerljive vsebnosti lasalocida, kot smo jih ugotovili v našem poskusu. Povprečne ugotovljene vsebnosti koncentracije lasalocida na folikel (AS) in mediane vseh analiziranih foliklov po posameznih dnevih poskusa prikazujemo na sliki 31.



\*dnevi krmljenja z lasalocidom

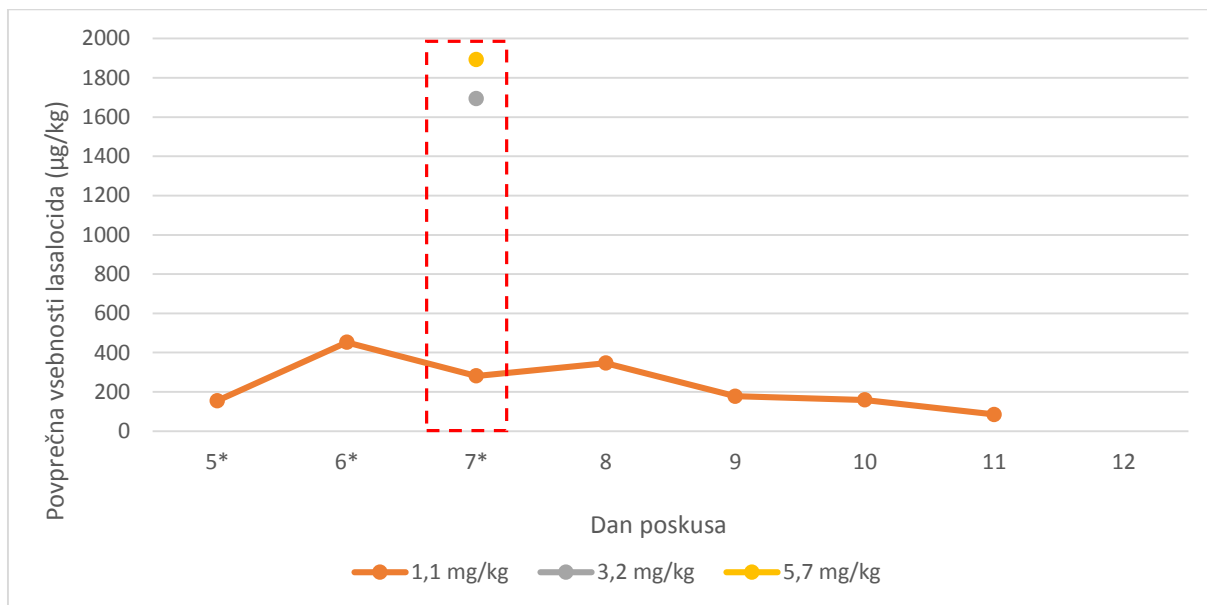
**Slika 31:** Prikaz koncentracije lasalocida na folikel, izražene v povprečnih vrednostih in mediani, po posameznih dnevih poskusa, med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (1,1 mg/kg).

**Figure 31:** The concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) of lasalocid in the follicle, expressed in average and median values, on the individual days of the experiment, during the treatment period and the depletion period after feeding with feed, containing lasalocid (1.1 mg/kg).

Iz slike 31 je razvidno hitro naraščanje lasalocida v jajčnih foliklih po začetku krmljenja. Iz tega lahko sklepamo, da ko je zdravilo prisotno v krmi, se začne hitro nalagati tudi v jajčnih foliklih. Po šestem dnevu krmljenja vsebnost pade, naraste pa ponovno osmi dan poskusa, to je dan po prenehanju dajanja krme z lasalocidom. Po osmem dnevu se vsebnost lasalocida postopoma znižuje. Dinamiko nalaganja v foliklih lahko razložimo/povežemo s fiziologijo nastajanja jajca, kjer je v zaključni fazi jajčnega folikla, ki traja od 7 do 10 dni značilna intenzivna tvorba rumenjaka v foliklih (Kan, 2003; Vandenberghe in sod., 2012). Jajčnik kokoši nesnice je v aktivni fazi nesnosti sestavljen iz treh vrst jajčnih foliklov, v katerih se lahko nalagajo lipoproteini. Zelo majhni folikli nastanejo v fazi upočasnjene razvoja v prvih 12 do 14 tednih starosti živali, ko se najprej razvije rumenjak bele barve (latebra), ta faza traja več mesecev ali celo leto. Sledi vmesna faza rasti, ko se začne pred začetkom nesnosti pri majhnem odstotku jajčnih foliklov nalagati rumenjak v citoplazmi. To medfazno obdobje traja do 60 dni. Zaključna faza ali faza intenzivne rasti jajčnega folikla traja od sedem do enajst dni. Zanj je

značilno hitro nalaganje rumenjaka v foliklih v obliki koncentričnih krogov, masa folikla se lahko poveča od 1 grama do 20 gramov. Po sprostitvi folikla v jajcevod se v jajcevodu tvori beljak, v uterusu pa trda jajčna lupina, kar traja 24 do 25 ur (Kan in Petz, 2000; Kan, 2003; Dolenc, 2010; Vandenberghe in sod., 2012)

Iz slike 32 je razviden prikaz in primerjava med povprečnimi vsebnostmi lasalocida v jajčnih foliklih pri vseh treh koncentracijah v krmi (5,7; 3,2 in 1,1 mg/kg krme).



\*dnevi krmljenja z lasalocidom

**Slika 32:** Prikaz prisotnosti povprečnih vrednosti lasalocida, izraženih v µg/kg, v jajčnih foliklih kokoši nesnic, med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (5,7 ; 3,2 in 1,1 mg/kg).

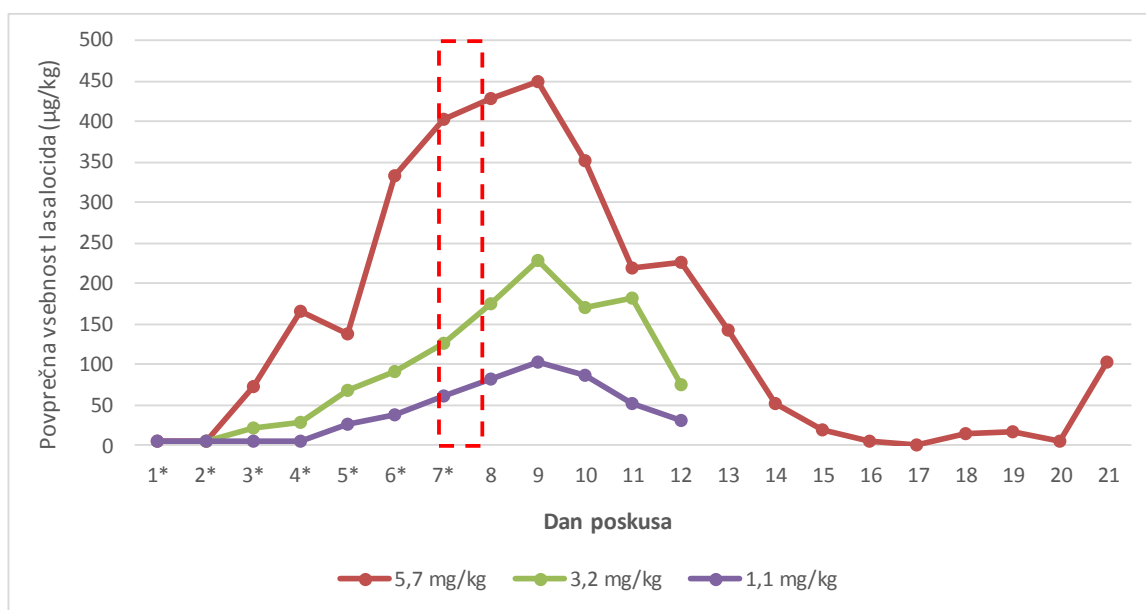
**Figure 32:** The average values of the presence of lasalocid (µg/kg) in egg follicles during the treatment period and the depletion period after feeding with feed of the three concentrations groups (5.7; 3.2 and 1.1 mg/kg).

V literaturi nismo zasledili podatkov o vsebnosti lasalocida v jajčnih foliklih. Dobljeni rezultati so novost. Z njimi smo dokazali, da se lasalocid še vedno nalaga v jajčnih foliklih, kljub temu, da ga je v krmi malo.

To lahko v praksi pomeni, da kokoši nesnice vsakodnevno dobivajo krmo, ki vsebuje opisane koncentracije lasalocida in posledica tega je lahko tudi stalna prisotnost lasalocida v jajčnem rumenjaku v različnih koncentracijah. Ista Direktiva (2009/8) navaja dopustne vrednosti lasalocida v krmi (3,75 mg/kg) tudi za druge živalske vrste, sem spadajo fazani in prepelice, kjer se je na podlagi rezultatov monitoringa iz Združenega kraljestva (EFSA, 2007) pokazalo,

da lahko vsebujejo živila teh živali, zlasti prepeličja jajca in meso, zelo visoke vsebnosti lasalocida.

Iz skupnega prikaza povprečnih vsebnosti lasalocida v rumenjaku kokoši nesnic, pri vseh treh koncentracijah lasalocida v krmi (slika 33), vidimo, da je bila dinamika nalaganja in izginjanja lasalocida pri vseh poskusih podobna. Naraščanje v času krmljenja, najvišje ugotovljene vsebnosti lasalocida deveti dan in padanje vsebnosti po prenehanju dajanja krme z lasalocidom. Rezultati potrjujejo dejstvo, da ostanki ionofonih kokcidiostatikov, zlasti lasalocida pri kokoših nesnicah privedejo do akumulacije zdravil v rumenjaku v času hitre faze rasti jajčnega folikla in od tu zdravilo ne potuje več v ostala tkiva živali. Zaradi akumulacije zdravila v jajčnem foliklu med to fazo nastanka jajca je pričakovati visoke koncentracije zdravil v rumenjaku še sedem do enajst dni po končanem dajanju zdravila (Kan, 2003; Goetting in sod., 2011; Hekman in Schefferlie, 2011; Vandenberghe in sod., 2012; Munoz in sod., 2014).



\*dnevi krmljeenja z lasalocidom

**Slika 33:** Prikaz povprečnih vsebnosti lasalocida v rumenjaku kokoši nesnic, izraženih v µg/kg, med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (5,7 ; 3,2 in 1,1 mg/kg).

**Figure 33:** The average values of the presence of lasalocid (µg/kg) in egg yolk during the treatment period and the depletion period after feeding with feed of the three concentrations groups (5.7; 3.2 and 1.1 mg/kg).

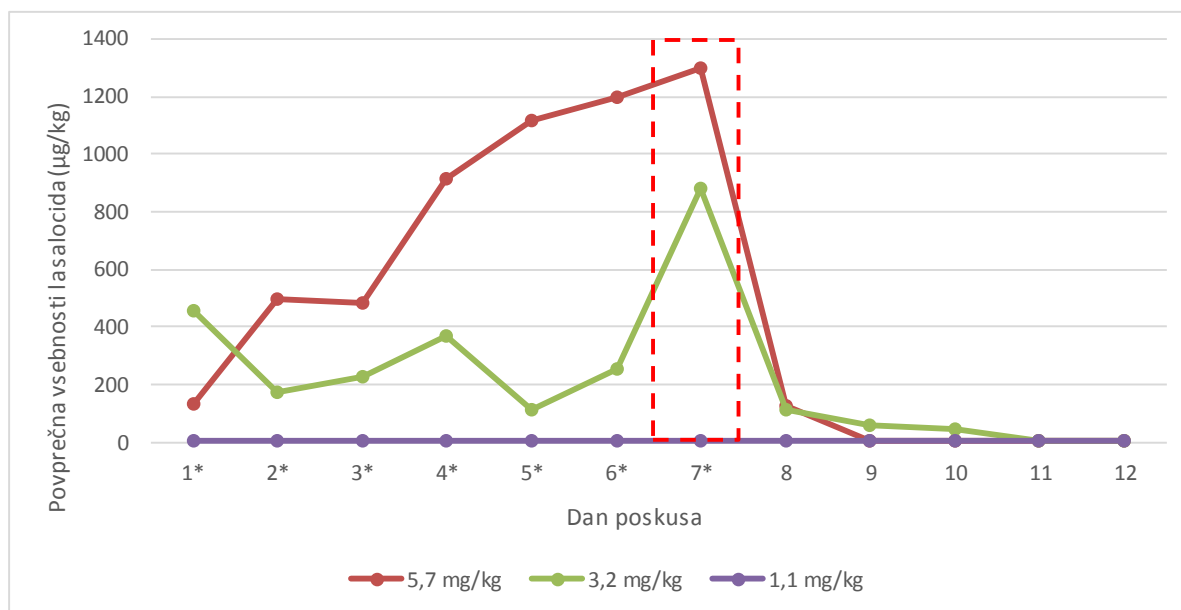
Pri vseh poskusih spremljanja dinamike pojavljanja in izginjanja lasalocida v iztrebkih smo ugotovili, da se je lasalocid v iztrebkih kokoši pojavil že po prvem krmljenju. Pri koncentraciji lasalocida v krmi (5,7 mg/kg) so vsebnosti lasalocida v analiziranih vzorcih iztrebkov hitro naraščale do sedmega dne, ko smo ugotovili najvišjo vsebnost (1300 µg/kg). Že naslednji dan (osmi dan poskusa) in prvi dan dajanja krme brez lasalocida je vsebnost strmo padla (130 µg/kg). Od devetega dne dalje pa so bile analizirane vsebnosti lasalocida v iztrebkih pod mejo zaznavnosti < 2,5 µg/kg.

Podobne ugotovitve lahko navedemo pri krmljenju kokoši s krmo, ki je vsebovala 3,2 mg lasalocida/kg. Tudi tu smo lasalocid v iztrebkih ugotovili že prvi dan poskusa, vrednosti so naraščale do sedmega dne, ko smo ugotovili najvišjo vsebnost lasalocida v iztrebkih (880 µg/kg), in nato hitro padale. Tri dni po prenehanju dajanja krme z lasalocidom smo v iztrebkih ugotovili še 45 µg/kg, od četrtega dne po prenehanju dajanja lasalocida pa so bile analizirane vsebnosti v iztrebkih pod mejo detekcije < 2,5 µg/kg.

Pri dajanju krme, ki je vsebovala 1,1 mg/kg smo ugotovili, da je bila njegova vsebnost v iztrebkih ves čas trajanja poskusa približno enaka (2,5 µg/kg) in tako ni bilo zaznati izrazitega povišanja v času dajanja krme z lasalocidom ter znižanja (padanja) po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da ostanejo pri tako nizki koncentraciji lasalocida v krmi vsebnosti le-tega v iztrebkih ves čas njegove prisotnosti v krmi na enaki ravni.

V literaturi najdemo malo podatkov o izločanju lasalocida z iztrebki, prav tako nismo zasledili podatkov, vezanih na poskuse pri kokoših nesnicah. Pri študijah metabolizma lasalocida pri piščancih in puranih so redki raziskovalci proučevali tudi izločanje lasalocida z iztrebki. Rezultati našega poskusa kažejo, da se lasalocid z iztrebki izloča ves čas krmljenja s krmo, ki vsebuje lasalocid, ne glede na koncentracijo, ki je prisotna v krmi. Ugotovili smo, da pri koncentraciji lasalocida v krmi (5,7 in 3,2 mg/kg) po prenehanju dajanja takšne krme, vsebnost lasalocida v iztrebkih hitro pade, se hitro zmanjša. Pri koncentraciji lasalocida v krmi (1,1 mg/kg), pa je lasalocid prisoten tudi še po prenehanju dajanja takšne krme (slika 34). Podobne ugotovitve navaja Lehel s sodelavci (1995). Ugotovili so, da se je pri piščancih v osemindesetih urah z iztrebki izločilo 95 % zaužitega lasalocida, vendar je bila uporabljena terapevtska doza. Rezultati pri kokoših nesnicah so novost. Menimo, da bi bil delež izločenega

lasalocida z iztrebki pri kokoših lahko manjši, saj se del zaužitega lasalocida naloži v jajčne folikle in tam tudi ostane.



\*dnevi krmljenja z lasalocidom

**Slika 34:** Prikaz povprečnih vsebnosti lasalocida v iztrebkih kokoši nesnic, izraženih v µg/kg, med in po prenehanju krmljenja s krmo, ki je vsebovala lasalocid (5,7 ; 3,2 in 1,1 mg/kg).

**Figure 34:** The average values of the presence of lasalocid (µg/kg) the faeces of laying hens, during the treatment period and the depletion period after feeding with feed of all the three concentrations groups (5.7; 3.2 and 1.1 mg/kg).

Poznavanje mehanizma izločanja lasalocida z iztrebki je pomembno zaradi vpliva na okolje, obnašanje v tleh, v vodi ter vplivom na rastline in mikroorganizme v zemlji. Ugotovljeno je, da se lasalocid v različnih zemljinah obnaša zelo različno. V peščeni in navadni glini so 50 % padec aktivnosti lasalocida ugotovili že po dveh dneh, pri silikatni glini pa šele po štirinajstih dneh, kar pomeni, da takšna tla bistveno dalj časa vsebujejo lasalocid, kar povezujejo z njegovo vezavo na komponente v zemlji (EFSA, 2004). Ugotovljeno je tudi, da se lasalocid v gnoju razgradi bistveno hitreje, če ga kompostiramo (razpolovna doba je 17,5 dni; pri nekompostiranem pa 61,8 dni), zato predstavlja uporaba kompostiranega gnoja tudi manj tveganja za okolje (Žižek in sod.; 2015). Menimo, da je tovrstne podatke potrebno upoštevati pri načrtovanju objektov za intenzivno rejo perutnine.

Zaključimo lahko, da prisotnost kokcidiostatikov/lasalocida v krmi pomeni tudi njegovo izločanje z iztrebki, kar lahko uporabljamo kot sledila in indikatorje izvora kmetijskega

onesnaženja. Pri višjih koncentracijah v krmi je opazno naraščanje v času krmljenja in hiter padec po prenehanju dajanja krme z lasalocidom, pri nizki koncentraciji v krmi (1,1 mg) pa je lasalocid v iztrebkih prisoten še pet dni po prenehanju dajanja krme z lasalocidom.

Nesporna ugotovitev je, da se je v praksi nemogoče izogniti navzkrižni kontaminaciji krme z zdravilnimi dodatki, posebno s kokcidiostatiki. Z rezultati naših poskusov na kokoših nesnicah, za katere lasalocid kot krmni dodatek ni dovoljen, smo z znano koncentracijo v krmi proučevali njegove ostanke v različnih tkivih ter mehanizme nalaganja v času krmljenja in izginjanja po prenehanju dajanja krme z lasalocidom. Še posebej so nas zanimali vzorci rumenjakov in jajčnih foliklov, predvsem s stališča uporabe teh snovi kot samostojnih živil (živilska industrija, usmerjena prehrana, razne diete) ob upoštevanju dejstva, da je lasalocida v beljaku zelo malo.

Dokazana prisotnost lasalocida v rumenjaku in jajčnih foliklih tudi pri najnižji koncentraciji v krmi (1,1 mg/kg) pomeni, da bi bilo priporočljivo spremljati njegovo prisotnost v obeh tkivih, prav tako pa moramo biti na to pozorni pri uporabi rumenjaka in jajčnih foliklov kot samostojnega živila. Kljub temu da pri nobeni koncentraciji lasalocida v krmi in njegovih ostankih v rumenjakih ADI za lasalocid na priporočen obrok jajc ni bil presežen, priporočamo previdnost pri uživanju večjega števila jajc dnevno, še zlasti pri usmerjeni in enolični prehrani.

Dobljeni rezultati bodo lahko v pomoč pri odločitvah za morebitno spreminjanje zakonodaje, pripravah analiz tveganja in uvajanju monitoringa za jajca prepelic. Uporabljena modificirana analitska metoda za ugotavljanje lasalocida v iztrebkih pa predstavlja odlično izhodišče za uporabo v rutinske namene.

Z raziskavo smo opozorili na problematiko nenamerne navzkrižne kontaminacije krme s kokcidiostatiki za neciljne živali in prisotnost lasalocida v rumenjakih in jajčnih foliklih tudi pri njegovi zakonsko dovoljeni količini v krmi ter nakazali morebitne vplive na obremenitev okolja, ko se kokcidiostatiki/lasalocid izločajo z iztrebki. Opravljeno delo predstavlja doprinos k dvema pomembnima vejama moderne znanosti: prehranski in okoljski problematiki.

Ker predstavljajo perutninsko meso in drugi perutninski izdelki ter jajca pomemben del živil v prehrani ljudi, je poznavanje problematike ostankov zdravil ključnega pomena za zagotavljanje varne hrane.

Zagotavljanje varne hrane in ohranjanje čistega okolja sta temeljni vodili trajnostnega razvoja v osveščenih in naprednih državah.



## 6. ZAKLJUČKI

1. Kokcidiostatiki, posebej še lasalocid predstavljajo problem pri nenamerni navzkrižni kontaminaciji v mešalnicah krmil.
2. Prisotnost lasalocida v krmi, namenjeni kokoši nesnicam, pomeni njegovo nalaganje predvsem v rumenjaku in jajčnih foliklih.
3. Tudi pri koncentraciji lasalocida 1,1 mg/kg krme za neciljne živali, ki je zakonsko dovoljena, kot posledica nenamerne navzkrižne kontaminacije in naj ne bi povzročala prekomernih ostankov lasalocida v jajcih, najdemo v rumenjaku vsebnosti, ki presegajo vrednosti MRL za jajca.
4. Smiselno bi bilo razmisliti o kontroli lasalocida v rumenjaku ali pa določiti MRL samo za rumenjaka, ker se le-ta uporablja kot samostojno živilo. Znano pa je, da v beljaku lasalocida praktično ni.
5. Uživanje rumenjaka kot samostojnega živila v obroku pri vseh treh koncentracijah v naših raziskavah ne presega ADI za lasalocid, vendar priporočamo previdnost pri uživanju večje količine jajc dnevno.
6. Vsebnost lasalocida v jajčnih foliklih je statistično značilno soodvisna od mase folikla, večji kot je folikel, več lasalocida vsebuje. Ugotovitve so pomembne s stališča uporabe jajčnih foliklov kot samostojnega živila.
7. Enačbe/izračuna Kennedyja ne moremo uporabiti za rumenjaka, saj so bile analizirane vsebnosti lasalocida v rumenjaku nekajkrat višje pri vseh poskusih. Pri preračunu na celo jajce smo prav tako ugotovili odstopanja, ki so posledica večjih spremenljivk (velikost jajca, razlike v koncentracijah lasalocida v rumenjakih med dnevi).
8. Predlog za monitoring ali pa vsaj posnetek stanja na trgu tudi za prepeličja jajca: prepelice spadajo prav tako med neciljne živali, za katere lasalocid ni dovoljen kot krmni dodatek, jajca pa so na trgu dostopna potrošnikom.
9. Lasalocid se izloča predvsem z iztrebki. Ugotovili smo, da po prenehanju dajanja takšne krme njegova vsebnost v iztrebkih zelo hitro pade. Ker pa smo ga ugotovili tudi v iztrebkih živali, ki so bile krmljene s krmo, ki je vsebovala lasalocid v koncentraciji 1,1 mg/kg, kjer ostane ves čas na enakem nivoju, priporočamo spremljanje njegove prisotnosti v okolju.

## **7. POVZETEK**

Kokcidioza tako pri nas kot v svetu še vedno predstavlja gospodarsko najpomembnejšo parazitarno bolezen v intenzivni reji perutnine, še posebej v reji piščancev brojlerjev in puranov. Bolezen v akutni obliki najpogosteje prizadene mlade živali in zaradi visokih poginov, zmanjšanega prirasta in slabše proizvodnje povzroča velike škode. Kokcidiostatiki se v preprečevanju bolezni predvsem pa v preventivne namene uporabljajo še vedno izjemno pogosto. Načini vnosa zdravil so različni, prevladuje pa vnos s krmo. Med najpogosteje uporabljene kokcidiostatike štejemo danes polietrske ionoforne antibiotike, kamor spadajo lasalocid, salinomycin, monenzin, narazin, maduramicin in semiduramicin. Vsi so skladno z Uredbo Komisije št. 1831/2003 registrirani tudi kot krmni dodatki za piščance in purane, niso pa dovoljeni za kokoši nesnice in druge neciljne živali. V mešalnicah krmil, kjer izdelujejo različne vrste krmnih mešanic, ki si na proizvodni liniji sledijo ena za drugo, se lahko določena količina kokcidiostatika iz prejšnje serije, pojavi tudi v proizvodu (krmil) naslednje serije. Govorimo o nenamerni navzkrižni kontaminaciji, ki je najpogostejši vzrok na pojavljanje kokcidiostatikov v krmil za neciljne živali. Posledica nenamerne navzkrižne kontaminacije krme v proizvodnem procesu je pojavljanje ostankov kokcidiostatikov v živilih živalskega izvora (meso, jetra, mleko) in še posebej v jajcih.

Med njimi se je kljub terapevtski učinkovitosti in predpisani karenci, kot posebno problematičen pokazal ionoforni kokcidiostatik lasalocid, ki ga je zelo težko odstraniti iz mešalcev in proizvodnih poti v mešalnicah krmil. Posledica pojavljanja zaostankov lasalocida v jajcih kokoši nesnic, kjer ga ne bi smelo biti, je bila določitev vrednosti MRL za jajca.

Lasalocid je v skladu z Uredbo Komisije št. 1831/2003 registriran kot dovoljen krmni dodatek za preprečevanje kokcidioze za piščance in purane. Krmil za piščance se dodaja pri pitanju v količini od 75 mg/kg do 125 mg/kg od prvega dne do največ pet dni pred klanjem živali in pri puranih do 16. tedna, redijo pa jih do 21. tedna. Zaradi varovanja zdravja ljudi so za perutnino (piščance in purane) določene vrednosti MRL za živila, ki se uporabljajo za prehrano ljudi (Izvedbena Uredba Komisije št. 1277/2014). Zaradi neizbežne navzkrižne kontaminacije v proizvodnem procesu priprave krmil, so določene tudi vrednosti MRL za živila, ki izhajajo od neciljnih živali (Uredba Komisije št. 124/2009, Izvedbena Uredba Komisije št. 86/2012 in Uredba Komisije št. 610/2012), prav tako so zakonsko določene tudi mejne vrednosti kokcidiostatikov v krmil za neciljne živali, ki so posledica neizogibnega prenosa v mešalnicah

krmil (Direktiva Komisije, št. 2009/8). Direktiva določa, da so še sprejemljive vsebnosti tiste koncentracije, ki pomenijo 1 % najvišjih predpisanih vsebnosti kokcidiostatika (kot krmnega dodatka), kar je v primeru lasalocida 1,25 mg/kg krme.

Pričujoča doktorska disertacija obravnava problematiko uporabe kokcidiostatikov v intenzivni reji perutnine, navzkrižno kontaminacijo krme v proizvodnem procesu za neciljne živali ter njihove zaostanke v tkivih, še posebej v rumenjaku in jajčnih foliklih ter iztrebkih, s stališča varovanja zdravja ljudi in morebitnih obremenitev za okolje. Širši namen raziskovalnega dela je bilo proučevanje farmakokinetičnih lastnosti lasalocida v različnih tkivih kokoši nesnic, rumenjaki in jajčnih foliklih, na podlagi njegove znane koncentracije v krmi. Še posebej pozorno smo proučili rezultate analiziranih tkiv pri najnižji koncentraciji lasalocida v krmi, saj je le-ta blizu dovoljene vsebnosti, ki naj ne bi povzročala prekomernih zaostankov v živilih živalskega izvora, še zlasti v jajcih. Novost pa so podatki o vsebnosti lasalocida v jajčnih foliklih in iztrebkih. Krmi smo dodajali polovične vrednosti lasalocida od koncentracij, ki jih je v svoji oceni tveganja za zdravje ljudi upoštevala Evropska agencija za varnost hrane, ki je upoštevala 10 %, 5 % in 2 % (kar ustreza 12,5; 6,25 in 2,5 mg/kg krme) lasalocida glede na najvišje predpisane vsebnosti kokcidiostatika (125mg/kg krme). Kokoši nesnice v naših poskusih so s krmo sedem dni dobivale 5,7; 3,2 in 1,1 mg lasalocida na kg krme, kar ustreza 4,6 %, 2,6 % in 0,9 % (glede na najvišje predpisane vsebnosti lasalocida). Pri vseh koncentracijah v krmi smo proučevali tudi dinamiko pojavljanja in izginjanja lasalocida v iztrebkih kokoši nesnic.

Doktorsko delo podaja odgovore na naslednja bistvena vprašanja:

1. Ugotovili in proučili smo časovni potek izločanja lasalocida v jajcih, jajčnih foliklih ter ostalih tkivih (jetra, ledvica, maščoba, koža z maščobo, mišično tkivo) in iztrebkih na podlagi točno določene količine lasalocida v krmi.
2. Proučili smo, ali so zakonsko dovoljene vsebnosti lasalocida v krmi (1 % od najvišje predpisane vsebnosti lasalocida kot krmnega dodatka), ki so posledica navzkrižne kontaminacije v proizvodnem procesu ustrezne, da zaradi njih ne prihaja do preseganja MRL-vrednosti v različnih tkivih kokoši nesnic in s tem v živilih živalskega izvora za prehrano ljudi.

3. Proučili in ugotovili smo, ali predstavlja uživanje jajčnega rumenjaka kot samostojnega živila glede na priporočen dnevni vnos (ADI-vrednost) morebitno tveganje za zdravje ljudi.
4. Ocenili smo, ali je trenutno določena vrednost MRL za jajca zadovoljiva oz. ustrezna tudi za rumenjake kot samostojno živilo.
5. Z rezultati praktičnega poskusa smo potrdili postavljeno teorijo o ostankih lasalocida v živilih glede predvidene navzkrižne kontaminacije.
6. Z uporabo modificirane analitske metode za ugotavljanje lasalocida v iztrebkih smo proučili dinamiko izločanja lasalocida z iztrebki ob znani koncentraciji v krmi in njegov morebitni vpliv na okolje.

Praktične poskuse smo opravili na kokoših nesnicah pasemskega tipa Hisex brown, ki smo jim s krmo sedem dni dajali 5,7 mg ; 3,2 mg ; in 1,1 mg lasalocida na kg krme, nato pa jih še tri tedne krmili s krmo brez lasalocida. Dnevno smo za določanje vsebnosti lasalocida jemali vzorce iztrebkov in jajc (rumenjake in beljake) in po žrtvovanju določenega števila kokoši še posamezna tkiva (jetra, ledvica, abdominalno maščobo, kožo z maščobo, mišično tkivo) in jajčne folikle.

Za določanje lasalocida v krmi smo uporabili uradno metodo, objavljeno v Uredbi Komisije 152/2009, za določanje vsebnosti lasalocida v jajcih in tkivih nesnic smo uporabili LC-MS/MS metodo, za določanje lasalocida v iztrebkih kokoši smo uporabili modificirano metodo za ugotavljanje lasalocida in monensina v iztrebkih, razvito na Veterinarski fakulteti v Ljubljani (Veterinarska fakulteta, Standardni operativni postopek).

Pri najvišji koncentraciji lasalocida v krmi 5,7 mg/kg smo analizirali: jetra, ledvica, mišično tkivo, abdominalno maščobo, kožo z maščobo, beljake, rumenjake in jajčne folikle. Lasalocid smo v rumenjakih ugotovili že drugi dan krmljenja, največja ugotovljena vrednost je bila 617 µg/kg (sedmi dan). Vsebnosti nad MRL za jajca so se pojavljale še pet dni po prenehanju dajanja lasalocida. Vsebnosti lasalocida v jetrih, ledvicah in koži z maščobo so bile najvišje sedmi dan poskusa (193,; 54,; 80 µg/kg), po drugem dnevu prenehanja krmljenja z lasalocidom so se hitro znižale. Ugotovljene vsebnosti v mišičnem tkivu in jajčnem beljaku so bile ves čas poskusa zelo nizke (do 0,5 oziroma do 2,4 µg/kg ); povprečna vsebnost lasalocida v jajčnih foliklih sedmi dan pa je bila 1693 µg/kg.

V drugem poskusu (koncentracija lasalocida v krmi 3,2 mg/kg) smo analizirali: jetra, ledvica, kožo z maščobo, rumenjake in jajčne folikle. Lasalocid smo v rumenjakih prvič ugotovili tretji

dan poskusa (21 µg/kg), najvišja ugotovljena vsebnost pa je bila 478 µg/kg (deveti dan, to je drugi dan po prenehanju krmljenja z lasalocidom), vsebnosti nad MRL so se pojavljale še štiri dni po prenehanju dajanja krme (181 µg/kg). Vsebnosti lasalocida v jetrih, ledvicah in koži z maščobo so bile najvišje šesti dan (136, ; 51, ; 35 µg/kg). Po devetem dnevu so bile pod mejo zaznavnosti. Povprečna vsebnost lasalocida v jajčnih foliklih sedmi dan krmljenja z lasalocidom je bila 1892 µg/kg.

Pri najnižji koncentraciji lasalocida v krmi kokoši nesnic, (1,1 mg/kg) smo analizirali naslednje vzorce tkiv: jetra, kožo z maščobo, rumenjake in jajčne folikle. Lasalocid smo v rumenjakih prvič ugotovili četrty dan (43 µg/kg), najvišja ugotovljena vsebnost je bila 353 µg/kg (na deveti dan poskusa, to je drugi dan po prenehanju dodajanja kokcidostatika), vsebnosti nad MRL so se pojavljale še tri dni po prenehanju dajanja krme (200 µg/kg). Vsebnosti lasalocida v jetrih in koži z maščobo osmi dan (to je en dan po prenehanju dajanja kokcidostatika) so bile 20 in 28 µg/kg. V jajčnih foliklih so bile od petega do dvanajstega dne ugotovljene naslednje povprečne vsebnosti lasalocida: 154, 452, 281, 346, 177, 159 in 84 µg/kg. Vrednosti MRL za neciljne živali so bile pri analiziranih tkivih presežene pri koncentracijah lasalocida v krmi 5,7 in 3,2 mg/kg, ADI za lasalocid na priporočen obrok jajc ni bil presežen pri nobeni koncentraciji. Pri vseh koncentracijah lasalocida v krmi smo dokazali povezavo med maso folikla in vsebnostjo lasalocida v foliklu ( $R_s > 0,7$ ). Prav tako smo pri vseh koncentracijah lasalocida v krmi dokazali, da obstaja statistično značilna razlika v vsebnosti lasalocida v rumenjakih po posameznih dnevih, medtem ko v jajčnih foliklih statistično značilna razlika v koncentraciji lasalocida na folikel med kokošmi na določen dan ne obstaja. Iz tega sklepamo, da lahko pri podobnih koncentracijah lasalocida v krmi, v rumenjakih in v jajčnih foliklih pričakujemo primerljive vsebnosti lasalocida, kot smo jih ugotovili v naših poskusih (koncentracija lasalocida 5,7 mg/kg krme:  $\chi^2(11) = 49,097$ ,  $p = 0,000$ ; ( $\chi^2(5) = 10,018$ ;  $p = 0,075$ ; koncentracija lasalocida 3, 2 mg/kg krme:  $\chi^2(6) = 31,639$ ,  $p = 0,000$ ;  $\chi^2(5) = 14,460$ ,  $p = 0,013$ ; koncentracija lasalocida 1,1 mg/kg krme:  $\chi^2(11) = 95,476$ ;  $p = 0,000$ ;  $\chi^2(6) = 17,224$ ,  $p = 0,008$ ).

Ne glede na količino dodanega kokcidostatika smo z analizo vzorcev iztrebkov pri vseh poskusih ugotovili, da se je lasalocid v iztrebkih kokoši pojavil že prvi dan krmljenja, pri koncentraciji 5,7 mg/kg in 3,2 mg/kg pa je vsebnost lasalocida v iztrebkih naraščala do sedmega dne in po prenehanju dajanja krme z lasalocidom izredno hitro padla. Lasalocid smo v iztrebkih zadnjič ugotovili osmi dan (pri krmljenju s 5,7 mg lasalocida/kg krme) oziroma deseti dan (pri 3,2 mg lasalocida/kg krme). Kasneje so bile vse analizirane vsebnosti pri obeh koncentracijah

pod mejo zaznavnosti ( $< 2,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). Pri koncentraciji  $1,1 \text{ mg}/\text{kg}$  lasalocida/kg krme pa so bile vsebnosti lasalocida v analiziranih vzorcih iztrebkov vse dni poskusa približno na enaki ravni, in sicer  $2,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

Obsežno raziskovalno delo je pokazalo, da predstavlja kokcidiostatik lasalocid problem pri nenamerni navzkrižni kontaminaciji v mešalnicah krmil. Njegova prisotnost v krmi za kokoši nesnice pomeni njegove ostanke v živilih. Posebej so problematični rumenjaki in jajčni folikli, prisoten pa je tudi v iztrebkih.

Ugotovili smo, da lahko dovoljena vsebnost lasalocida v krmi ( $1,1 \text{ mg}/\text{kg}$ ) povzroča njegove ostanke v rumenjaku in jajčnih foliklih, ki presegajo vrednosti MRL za jajca. Zato bi bilo priporočljivo spremljati njegovo prisotnost v obeh tkivih, razmisliti o kontroli količine lasalocida v rumenjaku in določitvi vrednosti MRL samo za rumenjak. Predvsem pa je potrebno ugotovljena dejstva upoštevati pri uporabi rumenjaka in jajčnih foliklov kot samostojnega živila. Kljub temu da pri nobeni koncentraciji lasalocida v krmi in njegovih ostankih v rumenjakih ADI za lasalocid ni bil presežen, priporočamo previdnost pri uživanju večjega števila jajc dnevno, še zlasti pri usmerjeni in enolični prehrani.

Dobljeni rezultati bodo v pomoč pri odločitvah za morebitno spreminjanje zakonodaje, pripravah analiz tveganja in uvajanju monitoringa za jajca drugih vrst perutnine npr. prepelic. Uporabljena modificirana analitska metoda za ugotavljanje lasalocida v iztrebkih pa predstavlja odlično izhodišče za uporabo v rutinske namene.

Ker predstavljajo perutninsko meso in drugi perutninski izdelki ter jajca pomemben del živil v prehrani ljudi, je poznavanje problematike ostankov zdravil ključnega pomena za zagotavljanje varne hrane.

Opravljen delo predstavlja doprinos k dvema pomembnima vejama moderne znanosti – prehranski in okoljski problematiki. Zagotavljanje varne hrane in ohranjanje čistega okolja sta temeljni vodili trajnostnega razvoja v osveščenih in naprednih državah.

## **8. SUMMARY**

Coccidiosis still presents (in Slovenia and worldwide) the most important parasitic disease in the intensive rearing of poultry, especially in breeding of chickens, broilers and turkeys. Therefore, intensive poultry production without the use of coccidiostats for therapeutic and preventive purposes is practically no longer possible. There are several application methods of coccidiostats, but the most common one is the input with feed. The most frequently used coccidiostats today are polyether ionophore antibiotics, which include lasalocid, salinomycin, monensin, narasin, maduramicin and semiduramicin. They are all in line with Commission Regulation No. 1831/2003, registered as feed additives for chickens and turkeys, but not allowed for laying hens and other non-target animals. On the production line various types of compound feed are produced in consecutive batches – a certain amount of coccidiostat in the previous series will also appear in the product (feed) of the next batch. This is the reason for so called unintentional cross-contamination, which is the most common cause of emergence of coccidiostats in feed for non-target animals. As a result of inadvertent cross-contamination in feed production process, residues of coccidiostats may be present in foodstuffs of animal origin (meat, liver, milk) and especially in eggs.

Among them, despite its therapeutic efficacy and the prescribed withdrawal, ionophore coccidiostat lasalocid poses a special problem as it is very difficult to affectively remove it from the mixer and the production line. The occurrence of residues of lasalocid in eggs of laying hens prompted the EU Commission MRL value for eggs having been set.

Lasalocid is, in accordance with the Commission Regulation No. 1831/2003 registered as feed additive for prevention of coccidiosis in chickens and turkeys. Lasalocid is added to feed in case of extensive rearing in doses of 75 mg / kg to 125 mg / kg on the first day up to a maximum of five days, prior to slaughter of the animals. In order to protect human health, MRL values for foods intended for human consumption, are set for poultry – chickens and turkeys (Implementing Commission Regulation no. 1277/2014). Due to the unavoidable cross-contamination in the production process the MRL values set for foods derived from non-target animal have been defined (Commission Regulation no. 124/2009, implementing Commission Regulation no. 86/2012 and Commission Regulation no. 610/2012) also the statutory limit values coccidiostat in non-target feed resulting from the unavoidable cross-contamination (Commission Directive no. 2009/8). The Directive defines acceptable concentration levels of

those who constitute 1% of the maximum prescribed content coccidiostat (as a feed additive), which, in the case of lasalocid, is 1.25 mg / kg feed.

The present doctoral thesis studies the use of coccidiostats in the intensive rearing of poultry, cross-contamination in the production process of feed for non-target animals as well as residues of coccidiostats in tissues (especially in the yolk and egg follicles) and excrement, from the standpoint of human health and the possible detrimental effects on the environment. The broader purpose of the research was to study the pharmacokinetic properties of lasalocid in different tissues of laying hens, egg yolk and egg follicles, based on its known concentration in the feed. In particular, we carefully examined results of analysed tissues at the lowest concentration of lasalocid in feed, because it is close to permitted levels, which should not cause excessive residues in food of animal origin, particularly in eggs. The scientific novelty of the performed work is the data of the lasalocid content in egg follicles and in faeces. Feed was contaminated with half of the value of lasalocid concentrations that, took into account 10 % 5 % 2 % (equivalent to 12.5, 6.25 and 2.5 mg / kg feed) lasalocid according to the prescribed maximum content coccidiostat (125 mg / kg feed) according to the risk assessment for human health under European Food Safety Authority. Laying hens had the feed for seven days, treated with 5.7; 3.2 and 1.1 mg of lasalocid per kg feed which is an equivalent to 4.7 %, 2.5 % and 1 % (according to the maximum prescribed lasalocid level). We also studied the dynamics of lasalocid content in the faeces of laying hens.

Following hypotheses were examined in the thesis:

1. Identify and examine the time profile of excretion of lasalocid in eggs, egg follicles, and other tissues (liver, kidney, fat, skin fat, muscle tissue) and faeces on the basis of specific quantities of lasalocid in feed.
2. Determine, if legally allowed lasalocid content in feed (1% of the maximum prescribed lasalocid as a feed additive) which is the result of cross-contamination in the production process, is relevant and does not cause exceeding MRL values in different tissues of laying hens and consequently in foods of animal origin for human consumption.
3. Determine, if the consumption of egg yolk as an independent food item presents potential risk for human health, according to the recommended daily intake (ADI -value).



4. Assess, whether the currently set MRL values for eggs are suitable also for egg yolk as a separate item.
5. Examine through the practical experiments the theory raised on lasalocid residues in foodstuffs in regard to the known issue of the cross-contamination of feed for poultry.
6. With using a modified analytical methods for the determination of lasalocid in faeces explores the dynamics of lasalocid excretion in faeces at a known concentration in the feed and the potential impact on the environment.

Practical experiments were conducted on Hisex brown laying hens which were administered with 5.7 mg; 3.2 mg; and 1.1 mg of lasalocid per kg feed for seven days in a row, followed by three weeks of control feed without lasalocid. The level of lasalocid was determined daily by collecting samples of faeces and eggs (yolk and white) and individual tissues of a number of animals (liver, kidney, abdominal fat, skin, fat, muscle tissue) and egg follicle.

For the determination of lasalocid in feed we used the official method set out in Commission Regulation 152/2009, for the determination of lasalocid in eggs and tissues of hens we used LC-MS / MS method and for the determination of lasalocid in the faeces of chickens we used a modified method for determination of lasalocid and monensin in the faeces, which has been developed at the Veterinary Faculty, University of Ljubljana (UL, Veterinary Faculty, standard operating procedure).

At the highest exposed concentration of lasalocid in feed (5.7 mg/kg) we analysed liver, kidney, muscle tissue, abdominal fat, skin, fat, egg whites, egg yolks and egg follicle. Lasalocid was found in the yolks on the second day of feeding whereas the maximum value was found on the seventh day (617 mg/kg). Levels above MRLs for eggs were encountered in all five days after having stopped giving treated feed to animals. Lasalocid concentration in the liver, kidneys and skin with fat were highest on the seventh day of the experiment (193; 54; 80 mg/kg), while on the ninth day levels decreased rapidly as in muscle tissue and egg white concentrations were constantly very low (up to 0.5 or 2.4 mg/kg); the average concentration of lasalocid in egg follicles on the seventh day was 1.693 mg/kg.

In the second experiment (the concentration of lasalocid in feed 3.2 mg/kg) we analysed liver, kidneys, skin, fat, egg yolks and egg follicle. Lasalocid was first found in yolks on the third day of the experiment (21 mg/kg), the highest detected level was 478 mg/kg (ninth day),

concentrations above the MRL continued for four days after discontinuation of feed (181 mg/kg). Lasalocid concentration in the liver, kidneys and skin with fat were highest on the sixth day (136; 51; 35 mg/kg). On the ninth day concentrations were below the detection limit. The average concentration of lasalocid in egg follicles was 1.892 mg/kg on the seventh day.

The lowest concentration of lasalocid in feed for laying hens (1.1 mg/kg) was analysed for the following samples of tissues: liver, skin fat, egg yolks and egg follicle. Lasalocid was found in the yolks in the first four days (43 mg/kg); the highest detected level was 353 mg/kg (on the ninth day of the experiment), the concentrations above the MRL continued for three days after discontinuation of feed (200 mg/kg). Lasalocid concentrations in the liver and skin with fat on the eighth day were 20 and 28 mg/kg. The egg follicles had the following average lasalocid content: 154, 452, 281, 346, 177, 159 and 84 mg/kg from the fifth to the twelfth day. MRL values for non-target animals analysed in tissues exceeded concentrations of lasalocid in feed at concentrations 5.7 and 3.2 mg / kg, whereas the ADI for lasalocid (suitable meal of eggs for humans) was not exceeded at any concentration. We demonstrated correlation between mass and follicle containing lasalocid follicle ( $R > 0.7$ ) at all concentrations of lasalocid in feed. We have also shown that lasalocid concentrations in feed give statistically significant difference in the lasalocid content of yolks on individual days, while there was no significant difference in the concentration of lasalocid for egg follicle among examined population of hens. From this we conclude that at similar concentrations of lasalocid in feed we can expect comparable lasalocid content in yolks and egg follicles, as observed in our experiments (lasalocid concentration of 5.7 mg/kg feed:  $\chi^2(11) = 49.097$ ,  $p = 0.000$  ( $\chi^2(5) = 10.018$ ;  $p = 0.075$ ; lasalocid 3, 2 mg/kg of feed:  $\chi^2(6) = 31.639$ ,  $p = 0.000$ ;  $\chi^2(5) = 14.460$ ,  $p = 0.013$ ; lasalocid 1.1 mg/kg of feed:  $\chi^2(11) = 95.476$ ;  $p = 0.000$ ;  $\chi^2(6) = 17.224$ ,  $p = 0.008$ ).

In all experiments lasalocid was present in faeces of chickens on the first day of feeding at a concentration of 5.7 mg/kg and 3.2 mg/kg. The concentration of lasalocid in faeces increased until the seventh day and fell rapidly after having terminated giving treated feed to animals. The last time lasalocid was detected in faeces was on the eighth day (at 5.7 mg lasalocid /kg feed) and on the tenth day (at 3.2 mg lasalocid /kg feed). Later all analysed levels of concentrations were below the detection limit ( $< 2.5$  mg/kg). At a concentration of 1.1 mg/kg lasalocid/kg feed, lasalocid content was approximately at the same level of 2.5 mg/kg in the analysed samples of faeces every day of the experiment.

Extensive research has shown that the coccidiostat lasalocid poses a problem with inadvertent cross-contamination in feed compounder. Its presence in feed for laying hens can present its residues in food. Particularly problematic are egg yolks and follicles, as well as lasalocid presence in the chicken faeces.

We have found that the permissible level of lasalocid in feed (1.1 mg/kg) resulted in lasalocid concentrations in egg yolks and follicles that exceed the MRL value. It would therefore be advisable to monitor its presence in both tissues and control the concentration of lasalocid in egg yolks and specify the value of MRL for egg yolks alone, in particular. It is necessary to take into account the facts established when egg yolks and follicles are used in specialist diets containing only these products. Despite the fact that none of lasalocid feed and its residues in yolks exceeded ADI for lasalocid we recommend caution when consuming a large number of eggs daily, particularly in targeted and monotone diets.

The obtained results will help in the decision-making process relating to the possible modification of the laws, preparation of risk analysis and implementation of monitoring of quail eggs. The modified analytical method for the determination of lasalocid in faeces is an excellent choice for further use and routine application.

Since poultry and eggs present an important part of the food for human consumption, the detailed analysis of drug residues is crucial for ensuring food safety.

Work done represents a contribution to the two major branches of modern science - food and environmental issues.

Ensuring food safety and maintaining a clean environment are essential guides for sustainable development in advanced countries.

## **9. ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem spoštovanemu mentorju prof. dr. Antonu Venguštu, da je bil kljub krajši prekinitvi še vedno pripravljen ostati moj mentor ter me spremljati do uspešnega zaključka. Hvala za dobro voljo, za vsestransko pomoč, vodenje, razumevanje in potrpežljivost skozi celoten proces nastajanja dela.

Iskrena hvala somentorici prof. dr. Kseniji Šinigoj Gačnik, ki me je vsa ta leta nastajanja disertacije spodbujala, razumela in mi stala ob strani s svojim strokovnim znanjem in dragocenimi izkušnjami.

Vsem članom komisije se zahvaljujem za izredno korektno in hitro recenzijo dela, koristna priporočila in oceno naloge.

Vsem sodelavcem na vseh inštitutih, ki so sodelovali pri praktični izvedbi poskusa velik hvala za opravljeno delo.

Dr. Štefanu Pintariču za računalniško ureditev dokumenta, pripravo grafov in ureditev tabel. Opravil si veliko delo in mi s svojo pomočjo prihranil ogromno dragocenega časa. Štefan, hvala ti.

Mag. Mateji Nagode za statistično obdelavo podatkov, pomoč pri interpretaciji in dragocene strokovne napotke. Draga Mateja, hvala za potrpežljivost in razumevanje in hvala za Evico.

Mag. Giti Gresc – Smole za pregled in ureditev literature, ter vse drobne napotke, brez katerih naloga ne bi bila takšna, kot je.

Mag. Mateji Stvarnik iz Referata za študijske in študentske zadeve Veterinarske fakultete, za vsestransko pomoč, informacije z datumi in roki, dobro voljo in optimizem, da pridemo do zaključka. Mateja, hvala za vse.

Hvala Nini Gašperlin, profesorici slovenskega jezika in univ. dipl. sociol. kulture za lektoriranje slovenskega besedila in prof. Marti Štivec za lektoriranje angleškega besedila.

Delo predstavlja del Ciljnega raziskovalnega programa (CRP) »Konkurenčnost Slovenije 2006-2013«; št. V4-0322, ki je bil sofinanciran s strani MKGP in ARRS in Programske skupine P4-0092 v okviru programa »Zdravje živali, okolje in varna hrana«.

Spoštovani prijateljici in strokovni kolegici dr. Luciji Kolar iskrena hvala za prevod besedila v angleški jezik. Draga Lucija, predvsem pa se ti želim zahvaliti za tvoj neumorni optimizem,

neskončne pogovore ter vso ostalo podporo predvsem v zadnjem obdobju zaključka naloge. Vedno znova si mi dala pogum in samozaupanje, da zaključim še zadnjo zadevo iz mojega »prejšnjega življenja«. Hvala, da si.

Posebna zahvala gre moji dragi prijateljici Metodi Hrovat-Pirnat, s katero naju povezuje skoraj dvajset čudovitih let prijateljstva. Če ne bi bilo njenih visoko kvalificiranih obrtnikov, ki so naredili luknjo čez strop do moje kopalnice, se ne bi nikoli spoznali. Draga Metoda, hvala za izjemno podporo v zaključni fazi, dolge pogovore, ko nisem več vedela, kaj in kako, za čudovita kosila, s katerimi si me razvajala, razumevanje Tvoje družine, spremljanje napredka in zaupanje ... saj veš, »drugače nismo nič naredili« ... Hvala za prijateljstvo, čudovita si.

Hvala tudi vsem mojim dragim osebam, ki so ves čas verjele vame, me spodbujale, poslušale in podpirale, da sem prišla do zaključka.

Seveda pa ne morem mimo zahvale Princesi Maximiliani von Breznik Prvi, ki mi je vse čas zelo zavzeto in skrbno čuvala literaturo, najraje pravne podlage in vsestransko pomagala pri pisanju. ☺

## 10. LITERATURA

1. Uredba (ES) Evropskega parlamenta in Sveta št. 178/2002 z dne 28. januarja 2002 o določitvi splošnih načel in zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitvi Evropske agencije za varnost hrane in postopkih, ki zadevajo varnost hrane. Ur List EU 2002; L31/1: 463–86. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002R0178&rid=1> (31. 7. 2015)
2. Uredba Komisije (ES) št. 152/2009 z dne 27. januarja 2009 o določitvi metod vzorčenja in analitskih metod za uradni nadzor krme. Ur List EU 2009; L54: 1–130. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R0152&rid=1> (31. 7. 2015)
3. Kennedy DG, Blanchflower WJ, Huhges PJ, McCaughey WJ. The incidence and cause of lasalocid residues in eggs in Northern Ireland. Food Addit Contam 1996; 13: 787–94.
4. Direktiva Komisije (ES) št. 2009/8 z dne 10. februarja 2009 o spremembi Priloge I k Direktivi 2002/32/ES evropskega parlamenta in Sveta glede mejnih vrednosti kokcidiostatikov ali sredstev proti histomoniozi v krmi za neciljne živali zaradi neizogibnega prenosa. Ur List EU 2009; L40: 19–25. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009L0008&rid=1> (31. 7. 2015)
5. Direktiva 2002/32/ES evropskega parlamenta in Sveta z dne 7. maja 2002 o neželenih snoveh v krmi. Ur List EU 2002; L140/10: 3–14. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002L0032&rid=1> (31. 07. 2015)
6. Uredba Komisije (ES) št. 1055/2006 z dne 12. julija 2006 o spremembi prilog I in III k Uredbi Sveta (EGS) št. 2377/90 o določitvi postopka Skupnosti za določanje najvišjih mejnih vrednosti ostankov zdravil za uporabo v veterinarski medicini v živilih živalskega izvora glede flubendazola in lasalocida. Ur List EU 2006; L192: 3–5. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1055&rid=1> (31. 7. 2015)

7. Izvedbena Uredba Komisije (EU) št. 1277/2014 z dne 1. decembra 2014 o spremembi Uredbe (EU) št. 37/2010 glede snovi lasalocid. Ur List EU 2014; L346: 23–5. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R1277&rid=1> (31. 7. 2015)
8. Uredba Komisije (ES) št. 124/2009 z dne 10. februarja 2009 o določitvi mejnih vrednosti kokcidiostatikov ali sredstev proti histomoniozi v živilih zaradi neizogibnega prenosa teh snovi v krmo za neciljne živali. Ur List EU 2009; L40: 7–11. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R0124&rid=2> (31. 7. 2015)
9. Uredba Komisije (EU) št. 610/2012 z dne 7. julija 2012 o spremembi Uredbe (ES) št. 124 /2009 z dne 10. februarja 2009 o določitvi mejnih vrednosti kokcidiostatikov ali sredstev proti histomoniozi v živilih zaradi neizogibnega prenosa teh snovi v krmo za neciljne živali. Ur List EU 2012; L178: 1–3. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0610&rid=1> (31. 7. 2015)
10. EFSA (European Food Safety Authority). Update of an opinion of the Scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on the reevaluation of coccidiostat Avatec in accordance with article 9G of Council directive 70/524/EEC. EFSA J 2004; 77: 1–45.
11. EMA (European Medicines Agency). Committee for veterinary medicinal products: lasalocid sodium: summary report. London: EMA, 2004: 1–10 (EMEA/MRL/9 12/04–FINAL) [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500014596.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014596.pdf) ( 31. 7. 2015).
12. Hansen M. Anticoccidials in the environment: occurrence, fate, effects and risk assessment of ionophores. Copenhagen: University of Copenhagen, Faculty of Pharmaceutical Sciences, 2009. Doktorska disertacija.
13. Brglez J. Parazitologija za veterinarje: splošni del, diagnostične metode, protozoa, trematoda. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, VTOZD za veterinarstvo, 1989: 85–102.
14. Edgar SA. Field diagnosis of coccidiosis in chickens. Gainesville: Agri-Bio Corporation, 1992: 31–3.
15. Mrzel I. Nekatere značilnosti v intenzivnem perutninarstvu ob koncu tisočletja v Sloveniji. In: Peradarski dani: Zbornik . Poreč, 1999: 104–6.

16. Fajdiga M. Salinomycin v metafilaksi kokcidioze pri piščancih brojlerjih: doktorska disertacija. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2007.
17. Whiteman and Bickford's avian disease manual. 4<sup>th</sup> ed. Kennett Square: American Association of Avian Pathologists, 1996: 166–72.
18. Vengušt A, Zorman-Rojs O Žust J, Tavčar G. Problem of coccidiostats in intensive poultry production in Slovenia. *Krmiva* 1998; 40: 337–41.
19. Rose MD, Rowley L, Shearer G, Farrington WHH. Effect of cooking on veterinary drug residues in food. 6. Iasalocid. *J Agric Food Chem* 1997; 43: 927–30.
20. Vengušt A . Problematika zdravilnih dodatkov v krmnih mešanicah. In: Zbornik predavanj 9. posvetovanja o prehrani domačih živali, »Zdravčevi-Erjavčevi dnevi«. Radenci, 2000: 184–92.
21. Tavčar G, Vengušt A. Kokcidiostatiki v perutninski proizvodnji. In: Zbornik predavanj 15. posvetovanja o prehrani domačih živali, »Zdravčevi-Erjavčevi dnevi«. Radenci, 2006: 245–52.
22. Pressman BC, Fahim M. Cardiovascular toxicity of ionophores used a feed additives. *Adv Exp Biol* 1982; 161: 543–61.
23. Adams HR. Veterinary pharmacology and therapeutics. 8th ed Ames: Iowa State University Press, 2001: 1002–4.
24. Berger J, Rachlin AT, Scott WE, Sternabach LH, Goldberg MW. The isolation of three new crystalline antibiotics from *Streptomyces*. *J Am Chem Soc* 1951; 73: 5295– 8.
25. Pressman BC, Painter G, Fahim M. Molecular and biological properties of ionophores. In: Martell AE, ed. *Organic chemistry in biology and medicine*. Washington: American Chemical Society, 1980: 3–22.
26. EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the Scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on cross-contamination of non-target feedingstuffs by lasalocid authorised for use as a feed additive. *EFSA J* 2007; 553: 1–46.
27. Direktiva Sveta št. 70/524 z dne 23. novembra 1970 o dodatkih v krmi. *Ur List EU* 1970; L270: 1–206. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:31970L0524&rid=3> (15. 12. 2014)
28. Izvedbena Uredba Komisije (EU) št. 1014/2013 z dne 22. oktobra 2013 o spremembi uredb (ES) št. 2380/2001, (ES) št. 1289/2004, (ES) št. 1455/2004, (ES) št. 1800/2004,



- (ES) št. 600/2005, (EU) št. 874/2010, izvedbenih uredb (EU) št. 388/2011, (EU) št. 532/2011 in (EU) št. 900/2011 v zvezi z imenom imetnika dovoljenja za nekatere dodatke v živalski krmi. Ur List EU 2013; L281: 1–3. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R1014&rid=1> (15. 12. 2014)
29. Uredba Komisije (EU) št. 874/2010 z dne 5. oktobra 2010 o izdaji dovoljenja za lasalocid A natrij kot krmni dodatek za purane do 16 tednov (imetnik dovoljenja Alpharna (Belgija) BVBA) ter o spremembi Uredbe (ES) št. 2430/1999. Ur List EU 2010; L263: 1–3. [http://eur-lex.europa.eu/search.html?DTN=0874&DTA=2010&qid=1438712952884&DB\\_TYPE\\_OF\\_ACT=regulation&CASE\\_LAW\\_SUMMARY=false&DTS\\_DOM=ALL&typeOfActStatus=REGULATION&type=advanced](http://eur-lex.europa.eu/search.html?DTN=0874&DTA=2010&qid=1438712952884&DB_TYPE_OF_ACT=regulation&CASE_LAW_SUMMARY=false&DTS_DOM=ALL&typeOfActStatus=REGULATION&type=advanced) (15. 12. 2014)
30. Izvedbena Uredba Komisije (EU) št. 900/2011 z dne 7. septembra 2011 o izdaji dovoljenja za lasalocid A natrij kot krmni dodatek za fazane, pegatke, prepelice in jerebice, razen nesnic (imetnik dovoljenja je družba Alpharma (Belgija) BVBA). Ur List EU 2011; L231: 15– 6. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R0900&rid=1> (14.12. 2014)
31. Mehlhorn H, Pooch H, Raether W. The action of polyether ionophorus antibiotics (monensin, salinomycin, lasalocid) on development stages of *Eimeria tenella* (Coccidia, Sporozoa) in vivo and in vitro: study by light and electron microscopy. Z Parasitenkd 1983; 69: 457–71.
32. Edgar SA, Flanagan EG. Efficacy of new drug, lasalocid sodium, in prevention of coccidiosis in chickens. Poultry Sci 1974; 53 (4): 16–37.
34. Uredba Komisije (EU) št. 37/2010 z dne 22. decembra 2009 o farmakološko aktivnih snoveh in njihovi razvrstitvi glede mejnih vrednosti ostankov v živilih živalskega izvora. Ur List EU 2010; L15: 1–72. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R0037&rid=2> (15.5.2015)
35. Izvedbena Uredba Komisije (EU) št. 86/2012 z dne 1. februarja 2012 o spremembi Priloge k Uredbi (EU) št. 37/2010 o farmakološko aktivnih snoveh in njihovi razvrstitvi glede mejnih vrednosti ostankov v živilih živalskega izvora v zvezi s snovjo lasalocid. Ur List EU 2012; L30: 6–7. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0086&rid=1> ( 15. 5. 2015)

36. Butaye P, Devriese LA, Haesenbrouck F. Incomplete cross resistanc against ionophores in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from pigs and poultry. *Microb Drug Resist* 2000; 6 (1): 59–61.
37. Direktiva Komisije 2001/79/ES z dne 17. septembra 2001 o spremembi Direktive Sveta 87/153/EGS o določitvi smernic za oceno dodatkov v živalski prehrani. *Ur List EU* 2001; L267: 429–54. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001L0079&rid=1> (12.5.2015)
38. Peeters JE, Derijcke J, Verlinden M, Wyffels R. Sensitivity of avian *Eimeria* spp. to seven chemical and five ionophore anticocccidials in five Belgian integrated broiler operations. *Avian Dis* 1994; 38 (3): 483–93.
39. Stephan B, Rommel M, Dauschies A, Haberkorn A. Studies of resistance to anticocccidials in *Eimeria* field isolates and *Eimeria* strains. *Vet Parasitol* 1997; 69: 19–29.
40. Dauschies A, Gässlein U, Rommel M. Comparative efficacy of anizococccidials under the conditions of commercial broiler production and battery trials. *Vet Parasitol* 1998; 76: 163–71.
41. Peek HW, Landman WJM. Resistance to anticocccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2001. *Avian Pathol* 2003; 27 (4): 391–401.
42. Lehel J, Laczay P, Mora Z, Semjen G. Toxicological studies on potentiated ionophores in chickens: compatibility study. *Acta Vet Hung* 1995; 43 (23): 335–45.
43. Mitrovic M, Schildknecht EG. Anticocccidial activity of lasalocid (X-537A) in chicks. *Poultry Sci* 1974; 53: 1448–55.
44. Lodge NJA, Comben N, Roberts NL, Fairley C. Safety of lasalocid in turkeys and its compatibility with tiamulin. *Vet Rec* 1988; 122: 576–8.
45. Hanson LJ, Eisenbeis HC, Civens SV. Toxic effects of lasalocid in horses. *Am J Vet Res* 1981; 42: 456–61.
46. Kennedy DG, Blanchflower WJ, O'Dornan BC. Development of an ELISA for lasalocid and depletion kinetics of lasalocid in poultry. *Food Addit Contam* 1995; 12: 83–92.

47. Kennedy DG, Blanchflower WJ, Huhges PJ, McCaughey WJ. The incidence and cause of lasalocid residues in eggs in Northern Ireland. *Food Addit Contam* 1996; 13: 787–94.
48. EMA (European Medicines Agency). Committee for medicinal products for veterinary use: lasalocid sodium (extension to eggs): summary report. (EMEA/CVMP/46049/2006-FINAL). [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500014599.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014599.pdf) (14.12.2014)
49. Vandenberghe V. Transfer of cross-contamination levels of coccidiostats, antibiotics and anthelmintics from feed to poultry matrices. Ghent: University Ghent, Faculty of Veterinary Medicine, 2012. Doktorska disertacija.
50. Szucs G, Tamasi V, Laczay P, Monostory K. Biochemical background of toxic interaction between tiamulin and monensin. *Chem Biol Interact* 2004; 147 (2): 151–61.
51. Comben N. Toxicity of the ionophores. *Vet Rec* 1984; 114 (5): 128.
52. Ratz V, Laczay P, Mora Z, et al. Recent studies on the effects of tiamulin and monensin on hepatic cytochrome P450 activities in chickens and turkeys. *J Vet Pharmacol Ther* 1997; 20 (5): 415–8.
53. Meingassner JG, Schmook FP, Czok R, Mieth H. Enhancement of the anticoccidial activity of polyether antibiotics in chickens by tiamulin. *Poult Sci* 1979; 58 (2): 308–13.
54. Weisman Y, Herz A, Yegana Y, Egyed MN, Schlosberg A. The effect of tiamulin administered by different routes and at different ages to turkeys receiving monensin in their feed. *Vet Res Commun* 1983; 6 (3): 189–98.
55. Weisman Y, Herz A, Yegana Y, Egyed MN, Schlosberg A. Effect of tiamulin administered by various methods and dosages on turkeys at different ages. *Avian Dis* 1983; 27 (1): 218–24.
56. Strauch W. Is contamination-free feed production realistic? *Feed Tech* 2003; 7 (7): 23–5.
57. Kennedy DG, Hughes PJ, Blanchflower WJ. Ionophore residues in eggs in Northern Ireland: incidences and causes. *Food Addit Contam* 1998; 15 (5): 535–41.
58. McEvoy JDG, Smyth WG, Kennedy DG. Contamination of animal feedingstuffs with nicarbazine: investigations in a feed mill. *Food Addit Contam* 2003; 20 (2): 136–40.

59. Harner JP, Herrman T, Falk J, Behnke K. Avoiding drug carry-over during feed processing and delivery. Manhattan: Kansans State University, Agricultural Experiment Station, 1996. (MF-2055). <http://www.oznet.ksu.edu/library/grsci2/mf2055.pdf>
60. Strauch W. Causes and control of carry-over and cross-contamination. Kraftfutter/Feed Magazine 2002; 85 (4): 151-159 (Part 1); 2002; 85 (6): 239–49 (Part 2).
61. Noser J, Wenk P, Sutter A, Schneider P. Kokzidiostatika in Eiern. Geflügel-fleisch und Futtermitteln: Eine Stichproben-Kontrolle über den Nordwestschweizer Markt. Mitt Lebensm Hyg 2006; 97: 107–20.
62. Spiegel M, van den, Sterrenburg P, Egmond HJ van. Carry-over in compound feed production: interpretation of EU legislation concerning sampling and control strategies for carry-over of coccidiostats. Wageningen : RIKILT Wageningen UR; 2013: 46 p. (RIKILT report 2013.014)
63. Tavčar Kalcher G, Vengušt A, Zorman-Rojs O, Bajc Z, Ciglarič R. Lasalocid v jajcih in tkivih nesnic. In: Zbornik 17. posvetovanja o prehrani domačih živali. »Zdravčevi-Erjavčevi dnevi«. Radenci, 2008: 61–9.
64. Direktiva Sveta 96/23/ES z dne 29. aprila 1996 o ukrepih za spremljanje nekaterih snovi in njihovih ostankov v živih živalih in v živalskih proizvodih ter razveljavitvi direktiv 85/358/EGS in 86/469/EGS in odločb 89/187/EGS in 91/664/EGS. Ur List EU 1996; L 125: 10–32. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/HTML/?uri=CELEX:31996L0023&rid=2> (15. 12. 2014)
65. McEvoy JDG. Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulary aspects, incidence and control. Anal Chim Acta 2002; 473: 3–26.
66. Kan CA, Petz M. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. J Agric Food Chem 2000; 48: 6397–403.
67. Šinigoj Gačnik K, Tavčar G, Vengušt A. The dependence of the presence of lasalocid in broiler tissues on the presence of lasalocid in feed during the withdrawal period. In: EuroResidue V. Conference of residues of veterinary drugs in food. Noordwijkerhout, 2004: 874–8.

68. EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the Scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on the change of terms of the authorisation of »Avatec 15%« as a feed additive, regarding a new formulation (Avatec 150g) in accordance with Regulation (EC) No. 1831/2003. EFSA J 2005; 258: 1–8.
69. EMA (European Medicines Agency). Committee for medicinal products for veterinary use on the establishment of maximum residue limits: lasalocid sodium: summary report London: EMA, 2007. (EMEA/CVMP/192132/2007)
70. Šinigoj Gačnik K, Breznik B, Ciglarič R, et al. Coccidiostats residues in animal tissues and eggs in Slovenia, 1994–2007. In: 5th Central European Congress on Food. Bratislava, 2010: 144.
71. Veterinary Medicines Directorate, United Kingdom (UK-VMD). The Veterinary Medicines Directorate Annual Report on Surveillance for Veterinary Residues 1995–2005. New Haw Surrey, England.  
<https://www.gov.uk/government/organisations/veterinary-medicines-directorate>
72. Mortier L, Daeseleire E, Van Peteghem C. Determination of the ionophoric coccidiostats narasin, monensin, lasalocid and salinomycin in eggs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 2005; 19 (4): 533–9.
73. Mortier L, Huet AC, Charlier C, Daeseleire E, Delahaut P, Van Peteghem C. Incidence of residues of nine anticoccidials in eggs. Food Addit Contam 2005; 22 (11): 1120–5.
74. Piatkowska M, Jedziniak P, Żmudzki J. Residues of veterinary medicinal products and coccidiostats in eggs-causes, control and results of surveillance program in Poland. Pol J Vet Sci 2012; 15 (4): 803–12.
75. EMA (European Medicines Agency). European public MRL assessment report (EPMAR) Lasalocid (modification of the ADI and MRLs in poultry). London: EMA, 2015 (EMA/CVMP/769137/2014).
76. Rokka M, Jestoi M, Peltonen K. Trace level determination of polyether ionophores in feed. BioMed Res Int 2013; 2013: e151363 (12 p).  
<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/151363/>

77. Dorne JL, Fernandez-Cruz ML, Bertelsen U, et al. Risk assessment od coccidiostats during feed cross-contamination: animal and human health aspects. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 270: 196–208.
78. Domingo JL. Health risks of human exposure to chemical contaminants through egg consumption: a review. *Food Res Int* 2014; 56: 159–65.
79. Koroša A, Žižek S, Mali N. Možnosti pojavljanja kokcidiostatikov v okolju. *Geologija* 2014; 57 (1): 39–52.
80. Kan CA. Residues of veterinary drugs in eggs and possible explanations for their distribution between egg white and yolk. Wuppertal: Bergische Universitat Wuppertal, 2003. Doktorska disertacija.
81. Dolenc J, Tavčar Kalcher G, Vengušt A, Šinigoj Gačnik K. Navzkrižna kontaminacija krme s kokcidiostatiki in njihovi rezidui v jajcih. In: *Sledljivost v prehranski verigi: seminar od Evropskem veterinarskem tednu v Sloveniji*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2010: 83–94.
82. Goetting V, Lee KA, Tell LA. Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature. *J Vet Pharmacol Therap* 2011; 34: 521–56.
83. Hekman P, Schefferlie GJ. Kinetic modelling and residue depletion of drugs in eggs. *Br Poult Sci* 2011; 53 (3): 376–80.
84. Munoz R, Cornejo J, Maddaleno A, et al. Withdrawal time of oxitetracycline and tylosin in eggs of laying hens after oral administration. *J Food Prot* 2014; 77 (6): 1017–21.
85. Rice JA. *Mathematical statistics and data analysis*. 3rd ed. Belmont: Thomson/Brooks/Cole, 2007.
86. Hanley HG, Lewis RM, Hartley CJ, Franklin D, Schwartz A. Effects of an ionotropic agent, RO 2-2985 (X-537A), on regional blood flow and myocardial function in chronically instrumented conscious dogs and anesthetized dogs. *Circ Res* 1975; 37: 215–25.
87. Matsuoka T. Evaluation of monensin toxicity in the horse. *J Am Vet Med Assoc* 1976; 169 (10): 1098–100.

88. Kronfeld DS. Lasalocid toxicosis in inadequately for horses. *Vet Hum Toxicol* 2002; 44 (4): 245–7.
89. Weiss G, Felicito NR, Kaykaty M, et al. Tissue residue regulatory method for the determination of lasalocid sodium in cattle liver using HPLC with fluorometric detection. *J Agri Food Chem* 1983; 31(1): 75–8.
90. Mitrovic M, Schildknecht FC, Marusich WL. Comparative anticoccidial activity and compatibility of lasalocid in broiler chickens. *Poult Sci* 1974; 53: 1448–55.
91. Pressman BC, Fahim M. Pharmacology and toxicology of the monovalent carboxylic ionophores. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1982; 22: 465–90.
92. Espino L, Suarez ML, Mino N, Goicoa A, Fildago LE, Santamarina G. Suspected lasalocid poisoning in three dogs. *Vet Hum Toxicol*, 2003; 45 (5): 241–2.
93. Berlitz HD, Grosch W. *Food chemistry*. 2nd ed. Springer, Berlin; Heidelberg: 1999: 514.
94. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, Bundesinstitut für Risikobewertung. Berlin: Bewertung der Ergebnisse des nationales Rückstandskontrollplanes, 2008 und des Einfuhrückstandskontrollplanes 2008. [http://www.bfr.bund.de/cm/343/bewertung\\_der\\_ergebnisse\\_des\\_nationalen\\_rueckstands\\_kontrollplans\\_2008\\_und\\_des\\_einfuhrueckstandskontrollplans\\_2008.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/343/bewertung_der_ergebnisse_des_nationalen_rueckstands_kontrollplans_2008_und_des_einfuhrueckstandskontrollplans_2008.pdf): (14. 12. 2014)
95. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, Bundesinstitut für Risikobewertung. Berlin: Bewertung der Ergebnisse des nationales Rückstandskontrollplanes, 2009 und des Einfuhrückstandskontrollplanes 2009. [http://www.bfr.bund.de/cm/343/bewertung\\_der\\_ergebnisse\\_des\\_nationalen\\_rueckstands\\_kontrollplans\\_2009\\_und\\_des\\_einfuhrueckstandskontrollplans\\_2009.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/343/bewertung_der_ergebnisse_des_nationalen_rueckstands_kontrollplans_2009_und_des_einfuhrueckstandskontrollplans_2009.pdf): (14. 12. 2014)
96. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, Bundesinstitut für Risikobewertung. Berlin: Bewertung der Ergebnisse des nationales Rückstandskontrollplanes, 2011 und des Einfuhrückstandskontrollplanes 2011. (<http://www.bfr.bund.de/cm/343/bewertung-der-ergebnisse-des-nationalen-rueckstandskontrollplanes-2011-und-des-einfuhrueberwachungsplanes-2011.pdf>): (14. 12. 2014)

97. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, Bundesinstitut für Risikobewertung. Berlin: Bewertungsbericht zu den Ergebnissen des nationalen Rückstandskontrollplanes, 2012.  
<http://www.bfr.bund.de/cm/343/bewertungsbericht-zu-den-ergebnissen-des-nationalen-rueckstandskontrollplans-2012.pdf>: (14. 12. 2014)
98. Poročilo za leto 2008 o rezultatih monitoringa v živilih živalskega izvora in živih živalih. Ljubljana: Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Veterinarska uprava Republike Slovenije, 2008.  
[http://www.uvhvvr.gov.si/fileadmin/uvhvvr.gov.si/pageuploads/DELOVNA\\_PODROC\\_JA/Zivila/rezidua/Porocilo\\_rezidua\\_2008\\_in\\_2009.pdf](http://www.uvhvvr.gov.si/fileadmin/uvhvvr.gov.si/pageuploads/DELOVNA_PODROC_JA/Zivila/rezidua/Porocilo_rezidua_2008_in_2009.pdf), (14. 12. 2014)
99. Poročilo za leto 2009 o rezultatih monitoringa v živilih živalskega izvora in živih živalih. Ljubljana: Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Veterinarska uprava Republike Slovenije, 2009.  
[http://www.uvhvvr.gov.si/fileadmin/uvhvvr.gov.si/pageuploads/DELOVNA\\_PODROC\\_JA/Zivila/rezidua/Porocilo\\_rezidua\\_2008\\_in\\_2009.pdf](http://www.uvhvvr.gov.si/fileadmin/uvhvvr.gov.si/pageuploads/DELOVNA_PODROC_JA/Zivila/rezidua/Porocilo_rezidua_2008_in_2009.pdf), (14. 12. 2014)
100. Poročilo za leto 2010 o rezultatih monitoringa v živilih živalskega izvora in živih živalih. Ljubljana: Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Veterinarska uprava Republike Slovenije, 2010.  
[http://www.uvhvvr.gov.si/fileadmin/uvhvvr.gov.si/pageuploads/DELOVNA\\_PODROC\\_JA/Zivila/rezidua/Porocilo\\_MORES\\_2010\\_final.pdf](http://www.uvhvvr.gov.si/fileadmin/uvhvvr.gov.si/pageuploads/DELOVNA_PODROC_JA/Zivila/rezidua/Porocilo_MORES_2010_final.pdf), (14. 12. 2014)
101. Poročilo za leto 2012 o rezultatih monitoringa v živilih živalskega izvora in živih živalih. Ljubljana: Ministrstvo za kmetijstvo in okolje, Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, 2012.
102. Poročilo za leto 2013 o rezultatih monitoringa v živilih živalskega izvora in živih živalih. Ljubljana: Ministrstvo za kmetijstvo in okolje, Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, 2013.
103. Roxburgh JW, Wong RY. Lasalocid awareness and sampling in Scotland. *Int J Environ Health Res* 2010; 20 (3): 159–69.
104. Hansen M, Krogh KA, Brant A, Christensen JH, Halling-Sorensen B. Fate and antibacterial potency of anticoccidial drugs and their main abiotic degradation products. *Environ Pollut* 2009; 157 (2): 474–80.



105. Hansen M, Krogh KA, Brant A, Bjorklund E, Halling-Sorensen B. Environmental risk assessment of ionophores. *Trends Anal Chem* 2009; 28 (5): 534–42.
106. Vandenberghe V, Delezie E, Huyghebaert G, et al. Transfer of the coccidiostats monensin and lasalocid from feed at cross-contamination levels to whole egg, egg white and egg yolk. *Food Addit Contam A* 2012; 29(12):1881–92.
107. Gee R. Atrial fibrillation caused or worsened by lasalocid residue in eggs 1998-2005 updated Nov 2006 and May 2007, London.  
[http://www.dailystrength.org/c/Atrial\\_Fibrillation\\_AFib/forum/14301099-article-potential-cause](http://www.dailystrength.org/c/Atrial_Fibrillation_AFib/forum/14301099-article-potential-cause) (4. 11. 2010)
110. Dzikamunhenga RS. Safety evaluation of lasalocid use in farm-reared pheasants. Ames: Iowa State University, 2012. Magistrsko delo.
111. Ellis RL. Development of veterinary drug residue controls by the Codex Alimentarius Commission : a review. *Food Addit Contam Part A* 2008; 25 (12): 1432–8.
112. Statistični urad RS. Bilance proizvodnje in potrošnje kmetijskih proizvodov Slovenija, 2012 – končni podatki. Ljubljana: Statistični urad Republike Slovenije, 2014  
[http://www.stat.si/tema\\_okolje\\_kmetijstvo.asp](http://www.stat.si/tema_okolje_kmetijstvo.asp), pridobljeno (16. 12. 2014)
113. Eurostat. Production of meat: poultry. Bruxelles: European Commission, 2014.  
[http://ec.europa.eu/eurostat/web/agriculture/agricultural-production?p\\_auth=gRlBhzvY&p\\_p\\_id=estatsearchportlet\\_WAR\\_estatsearchportlet&p\\_p\\_lifecycle=1&p\\_p\\_state=maximized&p\\_p\\_mode=view&\\_estatsearchportlet\\_WAR\\_estatsearchportlet\\_action=search](http://ec.europa.eu/eurostat/web/agriculture/agricultural-production?p_auth=gRlBhzvY&p_p_id=estatsearchportlet_WAR_estatsearchportlet&p_p_lifecycle=1&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&_estatsearchportlet_WAR_estatsearchportlet_action=search), (16. 12. 2014)
114. Egg production in the EU. Godalming: Compassion in World farming, 2012.  
<http://www.compassionlebensmittelwirtschaft.de/media/5789260/laying-hens-egg-production-in-the-eu.pdf>, (16. 12. 2014)
115. Kronfeld DG. Lasalocid toxicosis is inadequately quantified for horses. *Vet Human Toxicol* 2002; 44(4): 245–7.
116. Matsuoka T. Evaluation of monensin toxicity in the horse. *J Am Vet Med Assoc* 1976; 169(10):1098–100.

117. Nicpon J, Czerw P, Harps O, Deegen E. Salinomycin poisoning in a polich stud horse. *Tierärztl Prax Ausg G* 1997; 25 (5): 438–41.
118. Foreyet WJ, Parish SM, Forey KM. Lasalocid for improved weight gains and control of *Coccidia* in lambs. *Am J Vet Res* 1981; 42 (1): 57–60.
119. Galitzer SJ, Oehme FW, Bartley EE, Dayton AD. Lasalocid toxicity in cattle: acute clinicopathological changes. *J Anim Sci* 1981; 62: 1308–16.
120. Delfino J, Mathison GW, Smith MW. Effect of lasalocid on feedlot performance and energy partitioning in cattle. *J Anim Sci* 1988; 66: 136–50.
121. Kiser TE, Whisnant CS, Rabmo TW, Benyshek LL, Peterson LA. The effect of lasalocid supplementation in free choice mineral on performance of beef cows, heifers, and calves. *J Anim Sci* 1986; 63 (1): 81.
122. Fleck AT, Lusby KS, Wagner JJ, Garmendia JC, Wettermann RP. Protein supplementation with and without lasalocid for beef cows. *J Anim Sci* 1985; 61 (1): 468.
123. Goehring TB, Corah LR, Higgins JJ. Effect of energy and lasalocid on productivity of first-calf heifers. *J Anim Sci* 1989; 67: 1879–88.
124. Hopman B, Weber DW. Effect of lasalocid on fall-calving beef cows. *J Anim Sci* 1896; 63: 1722–7.
125. Wagner JJ, Lusby KS, Rakestraw J. Alternate supplement schedule with lasalocid for wintering range beef cows. *J Anim Sci* 1984; 59 (1): 435.
126. Holzgrafe DP, Jensen AH, Fahey GC Jr, Grummer RR. Effects od dietary alfaalfa-orchardgrass hay and lasalocid on sow reproductive performance. *J Anim Sci* 1986; 62: 1145–53.
127. Hasydon KD, Hale OM. Effect of lasalocid on reproductive performance and subsequent lactation in the sow. *J Anim Sci* 1988; 66: 1877–84.
128. Segev G, Baneth G, Levitin B, Schlosberg A, Aroch I. Accidental poisoning of 17 dogs with lasalocid. *Vet Rec* 2004; 7: 174–6.
129. Espino L, Suarez ML, Mino N, Goicoa A, Fidalgo LE, Santamarina G. Suspected lasalocid poisoning in three dogs. *Vet Human Toxicol* 2003; 45 (5): 241–2.

130. Goetting V, Lee KA, Tell LA. Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature. *J Vet Pharmacol Ther* 2011; 34: 521–56.
131. Donoghue D. Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns? *Poult Sci* 2003; 82: 618–21.
132. Kart A, Bilgili A. Ionophore antibiotics: toxicity, mode of action and neurotic aspect of carboxylic ionophores. *J Anim Vet Adv* 2008; 7 (6): 748–51.
133. Rong Y, Chen L, Zhu T, Song Y, Yu M, Shan Z. Egg consumption and risk of coronary heart disease and stroke: dose- response meta-analysis of prospective cohort studies. *Br Med J* 2013; 346: 8539.
134. Ryan S. What are the causea of atrial fibrillation? [http://a-fib.com/causes-atrial\\_fibrillation/](http://a-fib.com/causes-atrial_fibrillation/), (4. 7. 2015).
135. Žižek S, Dobeic M, Pintarič Š, Zidar P, Kobal S, Vidrih M. Degradation and dissipation of the veterinary ionophore lasalocid in manure and soil. *Chemosphere*, ( 31. 7. 2015 ) v tisku doi: [10.1016/j.chemosphere.2014.12.032](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.032).
136. Zidar E, Virant Celestina TV (2008), SOP 357: Postopek za določanje vsebnosti lasalocida in monenzina v vzorcih iztrebkov. Ljubljana, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, 1-15.