


ZAKLJUČNO POROČILO
O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA
NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA
PROGRAMA (CRP) »KONKURENČNOST SLOVENIJE 2006 – 2013«


 REPUBLIKA SLOVENIJA
 NOSILEC JAVNEGA POOLASTILA
 JAVNA AGENCIJA ZA RAZISKOVALNO DEJAVNOST
 REPUBLIKE SLOVENIJE, LJUBLJANA

I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta

1. Naziv težišča v okviru CRP: Posebni proizvodi in podpora sledljivosti	Prejeto: - 4 - 11 - 2008	Šifra: 0110
2. Šifra projekta: V4-0322	Šifra zadeve: 63113-360/2006 11	

3. Naslov projekta:
 Problematika izločanja kokcidostatikov v okolje in možnosti navzkrižne kontaminacije v verigi priprave krmnih mešanic

3. Naslov projekta

3.1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:
 Problematika izločanja kokcidostatikov v okolje in možnosti navzkrižne kontaminacije v verigi priprave krmnih mešanic

3.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:
 The problems of the pollution of the environment with coccidiostats and the possibility of cross contamination in the production of feedingsstuffs

4. Ključne besede projekta

4.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:
 Krma, kokcidostatiki, izločanje v okolje, navzkrižna kontaminacija

4.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:
 Feed, coccidiostats, pollution of the environment, cross contamination

5. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

Univerza v Ljubljani (Veterinarska fakulteta)

5.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

Inštitut za fizikalno biologijo

6. Sofinancer/sofinancerji:

MKGP

7. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

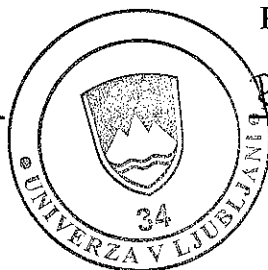
06006

Dr. Anton Vengušt

Datum: 30.10.2008

Podpis vodje projekta:

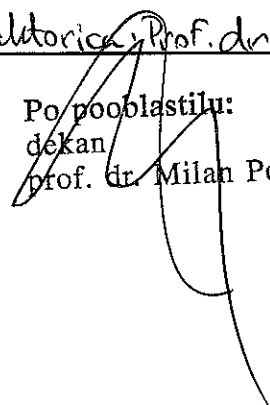
dr. Anton Vengušt



Podpis in žig izvajalca:

Retorica, Prof. dr. Andreja Kocijančič

Po pooblastilu:
dekan
prof. dr. Milan Pogačnik



II. Vsebinska struktura zaključnega poročila o rezultatih raziskovalnega projekta v okviru CRP

1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi?

- a) v celoti
 b) delno
 c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

- a) da
 b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

2. Vsebinsko poročilo o realizaciji predloženega programa dela¹:

Razvoj kemijskih metod:

V okviru projekta smo v skladu z načrtanim programom in odobrenimi sredstvi, po proučitvi v literaturi dostopnih metod določanja ionoforov v krmi, optimizirali in ovrednotili analitsko metodo za določanje monenzina in lasalocida v iztrebkih kokoši. Analitska metoda vključuje v prvi fazi ekstrakcijo obeh učinkovin iz iztrebkov (2,5 g homogeniziranih vlažnih iztrebkov) z mešanico etilacetata in izooktana (volumsko razmerje - 1:9) in nato dodatno čiščenje ekstraktov s pomočjo ekstrakcije na trdni fazi (SPE) z uporabo ekstrakcijskih kolonij LiChrolut Si ali Bakerbond SPE Silica gel (SiOH). Kolonije pred nanosom ekstrakta ustrezno kondicioniramo, nato pa po spiranju eluiramo učinkovino z mešanico diklorometana in metanola (volumsko razmerje - 9:1). Eluirane vzorce nato v drugi fazi postopka izparimo pod tokom dušika pri temperaturi 40°C skoraj do suhega in jih pred merjenjem na sistemu HPLC raztopimo v 1,0 ml metanola. Za detekcijo lasalocida uporabimo tekočinsko kromatografijo in fluorescenčno detekcijo (λ_{emis} : 420 nm; λ_{ext} : 300 nm). Kromatografsko ločbo izvedemo izokratsko z uporabo mobilne faze sestavljene iz 0,01 mol/L acetatnega pufru pH=4,0 in metanola (volumsko razmerje 15: 85) na kromatografski koloni Phenomenex Luna C18 (150 x 4.60 mm, 5 μm delci) z ustrezno predkolono C18 pri temperaturi 35°C in pretoku mobilne faze 1,0 mL/min. Monenzin določimo z metodo tekočinske kromatografije s pokolonsko derivatizacijo z vanilinom in detekcijo z UV/VIS ali diode array detektorjem pri valovni dolžini 520 nm. Kromatografsko ločbo izvedemo izokratsko z uporabo mobilne faze sestavljene iz metanola, deionizirane vode in očetne kisline v ustreznem razmerju, na kromatografski koloni Prodigy (250 x 4.60 mm) 5 μm ODS(2), pri sobni temperaturi in pretoku mobilne faze 0,9 mL/min. Sumljive in nepričakovane pozitivne rezultate, potrdimo s pokolonsko derivatizacijo s 4-(dimetilamino)benzaldehydom (DMAB).

Koncentracije monenzina oziroma lasalocida v vzorcih iztrebkov ovrednotimo po metodi eksterne standarda (ustrezna umeritvena krivulja). V setu meritev vzorcev vedno preverjamo izkoristek analitske metode s dvema ali tremi znanimi dodatki učinkovine k slepemu vzorcu iztrebkov (nezdravljene živali) in z dodatnim preverjanjem samega slepega vzorca, kar pri končnem izračunu vsebnosti tudi upoštevamo.

Omenjeni analitski metodi smo tudi ustrezno ovrednotili. Za obe učinkovini smo dosegli mejo detekcije (LOD) 2,5 $\mu\text{g/kg}$ in mejo kvantizacije (LOQ) 5,0 $\mu\text{g/kg}$, linearnost umeritvene krivulje, dobljene s čistimi standardnimi raztopinami v območju od 10 – 5000 ng/ml in linearnost umeritvene krivulje, dobljene z dodajanjem standardov v iztrebke od 50 – 1000 $\mu\text{g/kg}$ ter izkoristek ekstrakcije večji od 80 %. Dosegli smo tudi dobro ponovljivost merjenja znotraj dneva in med dnevi (RSD <10%).

Dobljeni rezultati kažejo, da sta metodi primerni za določanje vsebnosti monenzina in lasalocida v iztrebkih živali, ki so, ali so bile krmljene s krmo, ki vsebuje ta dva kokcidiostatika.

¹ Potrebno je napisati vsebinsko raziskovalno poročilo, kjer mora biti na kratko predstavljen program dela z raziskovalno hipotezo in metodološko-teoretičen opis raziskovanja pri njenem preverjanju ali zavračanju vključno s pridobljenimi rezultati projekta.

Poskus z monenzinom:

Poskus smo opravili na piščancih brojlerjih, ki so bili 35 dni krmljeni s krmo, ki je na kg vsebovala 100 mg monenzina. Po prenehanju krmljenja krme z monenzinom, smo 8 dni preverjali vsebnosti monenzina v iztrebkih živali (1., 3., 4., 7. in 8. dan po prenehanju krmljenja). V prvih 3-4 dneh po prenehanju krmljenja so se vsebnosti monenzina v povprečju gibale med $3,48 \pm 0,71$ in $1,94 \pm 0,08$ mg/kg vlažnih iztrebkov. Po 7. in 8. dnevu pa so koncentracije monenzina padle praktično že pod mejo detekcije ($2,5 \mu\text{g/kg}$ vlažnih iztrebkov). Iz rezultatov poskusa je jasno razvidno, da prve 4 dni po prenehanju krmljenja živali s krmo, ki vsebuje monenzin v predpisanih količinah, iztrebki vsebujejo monenzin v koncentracijah, ki predstavljajo obremenitev za okolje, če z njimi gnojimo kmetijske površine.

Poskus z lasalocidom:

Poskus smo opravili na dveh skupinah kokoši nesnic, ki smo jim s krmo en teden dajali 5,7 mg oziroma 3,2 mg lasalocida na kg krmne mešanice, nato pa jih še tri tedne krmili s krmo brez lasalocida. Dnevno smo za določevanje vsebnosti lasalocida jemali vzorce blata in jajc, občasno pa tudi kri in, po žrtvovanju določenega števila živali, posamezna tkiva (perje, kožo in podkožje, mišičnino, jetra, ledvica).

Rezultati preiskav so pokazali, da je pri vsebnosti 5,7 mg lasalocida na kg krme, jajčni rumenjaki že četrty dan krmljenja živali s krmo, ki je vsebovala lasalocid, vseboval v povprečju več kot $150 \mu\text{g/kg}$ lasalocida (MRL za lasalocid v jajcih je $150 \mu\text{g/kg}$), in da je ta vsebnost padla pod $150 \mu\text{g/kg}$ šele peti dan po prenehanju krmljenja take krme. Zelo visoke vsebnosti lasalocida so bile ugotovljene tudi v jajčnih foliklih žrtvovanih živali. Bistveno nižje vsebnosti lasalocida so bile ugotovljene v jajčnem beljaku, maščobi, mesu in ledvicah. V jetrih je visoka vsebnost lasalocida močno padla že en dan po prenehanju krmljenja živali z lasalocidom. Precejšnje vsebnosti lasalocida so bile ugotovljene tudi v koži in podkožju poskusnih živali. Zanimivo je, da je koža vsebovala povprečno $30 \mu\text{g/kg}$ lasalocida tudi še 21. dan poskusa, oziroma 14 dni po prenehanju krmljenja živali z lasalocidom.

V drugem poskusu (3,2 mg lasalocida/kg krme) je vsebnost lasalocida v jajčnem rumenjaku presegla $150 \mu\text{g/kg}$ šele osmi dan poskusa in na tem nivoju vztrajala do 12. dneva, to je še pet dni po prenehanju krmljenja krme z lasalocidom. Podobno visoke vsebnosti lasalocida so bile ugotovljene tudi v jajčnih foliklih žrtvovanih živali. V jetrih so bile vsebnosti lasalocida nad MRL ($100 \mu\text{g/kg}$) ugotovljene od 5. do 8. dne krmljenja krme z lasalocidom. V drugih preiskanih tkivih so bile vsebnosti lasalocida zelo nizke.

Razvoj optičnega nosilca za vezavo biosenzorja in sistema detekcije fluorescence:

Zasnova merilnega sistema:

Za fluorometrično detekcijo kokcidiostatikov smo kot nosilec uporabili optično vlakno, kamor smo imobilizirali protitelesa za monenzin/lasalocid. Optično vlakno (senzorni del) smo vstavili v pretočno celico, povezano z SIA sistemom, ki vsebuje črpalko in selekcijski ventil ter omogoča črpanje vzorca in reagentov v merilno celico z biosenzorjem. Nesenzorni del vlakna smo vpeli v fluorometer, kamor smo centriralni žarek diodnega laserja 635 nm. S fotopomnoževalko smo merili emitirano fluorescenco pravokotno na

optično vlakno. Biosenzor je temeljil na indirektnem imunskem testu. Pripravili smo fluorescentni konjugat monenzina/lasalocida. Za nosilec smo uporabili humani serumski albumin (HSA). Na HSA smo najprej s karbodiimidno metodo vezali monenzin/lasalocid in ga nato označili še s fluorescentnim barvilom AlexaFlour 647 (Invitrogen, ZDA). Vlakno z imobiliziranimi protitelesi smo nato najprej izpostavili raztopini kokcidiostatika, ki se je vezal na protitelesa na vlaknu, nato pa smo v pretočno celico včrpali še označeni fluorescentni konjugat, ki naj bi zasedel preostala prosta vezavna mesta protiteles na vlaknu. Z diodnim laserjem smo nato eksčitirali fluorescentne konjugate v radiju cca 500 nm od površine vlakna (torej večinoma le vezane konjugate) in merili emitirano fluorescenco. Najprej smo testirali vezavo čistega konjugata na optično vlakno. Pri včrpanju konjugata redčenega v razmerju 1/200 smo opazili naraščanje fluorescence, ki je posledica vezave konjugata na površino optičnega vlakna. Regeneracija vlakna je bila neuspešna, zato je bila začetna stopnja fluorescence pri vsakem naslednjem testu višja. Hitrost vezave protiteles, ki jo izračunamo iz nagiba fluorescenčne krivulje pri včrpanju konjugata je pri vlaknu z vezanimi protitelesi in brez protiteles primerljiva, zato sklepamo, da je prišlo do nespecifičnih interakcij med proteini na površini optičnega vlakna in nosilnim proteinom konjugata. Ker vpliva nespecifičnih interakcij nismo uspeli zadovoljivo odpraviti smo raziskavo nadaljevali na merilnem sistemu Biacore.

Detekcija monenzina/lasalocida s površinsko plazmnsko resonanco

Površinska plazmnska resonanca je pojav, pri katerem lahko zaradi spremembe lomnega količnika v tanki plasti nad površino biosenzorja (200 nm) spremljamo biološke interakcije. Biosenzor je v obliki čipa, prevlečenega s tanko plastjo zlata, na katerega vežemo specifični ligand. Preko mikrofluidnega sistema na čip vodimo neznano raztopino, v primeru da vsebuje tarčni analit, se bo ta vezal na ligand, zaradi česar se bo spremenil lomni količnik na površini čipa. V čip je usmerjen laser, ki pod določenim uklonskim kotom povzroči resonanco plazmonov na površini zlata. Ob spremembi lomnega količnika se uklonski kot, pri katerem pride do plazmnske resonance spremeni, kar spremljamo z detektorjem. Poskuse na čipu smo izvajali z refraktometrom Biacore T100 (Biacore, SWE), ki je eden izmed najnovjših modelov refraktometra podjetja Biacore in omogoča avtomatsko procesiranje čipov s štirimi merilnimi celicami in detekcijo analitov >100 Da. Za nosilec smo izbrali čip CM5 (Biacore, SWE). Gre za standardni čip, ki ima na površini zlata vezane karboksimetilne skupine in je primeren za vezavo širokega spektra ligandov z modificirano karbodiimidno metodo. Čip ima štiri celice, po dve merilni in dve referenčni. Za biosenzor smo izbrali dva imunometrična principa:

- Imobilizacija protiteles za monenzin/lasalocid na čip ter neposredno merjenje koncentracije analita v vzorcu
- Imobilizacija monenzina/lasalocida na čip. Pred vbrizgom se vzorcu doda protitelesa v prebitku, ki se vežejo z analitom (če je ta prisoten). Sledi nanos na čip. Spremljamo vezavo nezasedenih protiteles na čip, ki je inverzno proporcionalna količini analita v vzorcu.

Pred vezavo protiteles na čip smo antiserum očistili na FPLC s HiTrap rProtein A FF afinitetno kolono (GE Healthcare, SWE). Protein A v koloni z veliko afiniteto veže Fc regije IgG protiteles, medtem ko se ostali proteini sperejo iz kolone. IgG protitelesa smo sprali iz kolone s postopnim nižanjem pH 0,1 M Na-citratnega pufra, za nadaljne poskuse smo izbrali frakcijo z najvišjo absorbanco pri 280 nm. Protitelesa smo nadalje razsolili in skoncentrirali z Microcon YM-10 ultrafiltracijskimi kolonami (Milipore, ZDA). Protitelesa smo pred vezavo redčili v vezavnem pufu (10 mM citrat, pH 4) do

koncentracije 130 ug/ml. Karboksi skupine na CM5 čipu smo aktivirali z modificirano karbodiimidno metodo (EDC/NHS), nato pa vbrizgali protitelesa, ki so se s prostimi amino skupinami kovalentno vezala na aktiviran karboksimetil. Nezasedena mesta smo blokirali z 1 M etanolaminom – HCl, pH 8,5. Enak postopek smo izvedli v referenčni celici, le brez vezave protiteles, da smo med meritvami lahko odštevali nespecifično ozadje. Pri titraciji čipa z redčitveno vrsto substance smo dobili zelo šibke odzive. Razlike med odzivi pri različnih koncentracijah so bile blizu območja šuma. Opazen je trend naraščanja odziva z naraščujočo koncentracijo, ki pa se ustavi pri koncentraciji 1,59 uM. Razlog bi lahko bil DMSO, ki je bil prisoten v redčitvah, njegov relativni delež je naraščal sorazmerno s koncentracijo kokcidiostatika. DMSO že v zelo majhnih količinah povzroča velike spremembe v lomnem količniku medija . Ko smo odšteli signal za DMSO, odziv ni bil več signifikantno koncentracijsko odvisen. Rezultati so pokazali, da preizkušeni format ni primeren za detekcijo uporabljenih substanc v realnih vzorcih. Razmerje molekulskih mas analit/protitelo (700 Da/150 kDa) je premajhno, da bi lahko zanesljivo merili nizke koncentracije monenzina v vzorcu. Poleg tega se mora v realnih vzorcih predhodno opraviti ekstrakcija analita z organskimi topili (DMSO, MeOH), ki zaradi visokih sprememb v lomnih količnikih medija zakrijejo že tako majhen odziv na površini čipa. Biacore T100 sicer teoretično zagotavlja detekcijo analitov velikosti do 100 Da, vendar je za tak eksperiment potrebno imobilizirati protitelesa visoke afinitete (monoklonska) in čistosti (afinitetna kromatografija s tarčnim analitom). Prav tako je potrebno zelo natančno uskladiti koncentracije topil v vzorčni raztopini in nosilnem pufru, kar za hitre diagnostične postopke v kompleksnih vzorcih (iztrebki, tkiva, krmila) ni ustrezno.

3. Izkoriščanje dobljenih rezultatov:

3.1. Kakšen je potencialni pomen² rezultatov vašega raziskovalnega projekta za:

- a) odkritje novih znanstvenih spoznanj;
- b) izpopolnitev oziroma razširitev metodološkega instrumentarija;
- c) razvoj svojega temeljnega raziskovanja;
- d) razvoj drugih temeljnih znanosti;
- e) razvoj novih tehnologij in drugih razvojnih raziskav.

3.2. Označite s katerimi družbeno-ekonomskimi cilji (po metodologiji OECD-ja) sovpadajo rezultati vašega raziskovalnega projekta:

- a) razvoj kmetijstva, gozdarstva in ribolova - Vključuje RR, ki je v osnovi namenjen razvoju in podpori teh dejavnosti;
- b) pospeševanje industrijskega razvoja - vključuje RR, ki v osnovi podpira razvoj industrije, vključno s proizvodnjo, gradbeništvom, prodajo na debelo in drobno, restavracijami in hoteli, bančništvom, zavarovalnicami in drugimi gospodarskimi dejavnostmi;
- c) proizvodnja in racionalna izraba energije - vključuje RR-dejavnosti, ki so v funkciji dobave, proizvodnje, hranjenja in distribucije vseh oblik energije. V to skupino je treba vključiti tudi RR vodnih virov in nuklearne energije;
- d) razvoj infrastrukture - Ta skupina vključuje dve podskupini:
 - transport in telekomunikacije - Vključen je RR, ki je usmerjen v izboljšavo in povečanje varnosti prometnih sistemov, vključno z varnostjo v prometu;
 - prostorsko planiranje mest in podeželja - Vključen je RR, ki se nanaša na skupno načrtovanje mest in podeželja, boljše pogoje bivanja in izboljšave v okolju;
- e) nadzor in skrb za okolje - Vključuje RR, ki je usmerjen v ohranjanje fizičnega okolja. Zajema onesnaževanje zraka, voda, zemlje in spodnjih slojev, onesnaženje zaradi hrupa, odlaganja trdnih odpadkov in sevanja. Razdeljen je v dve skupini:
- f) zdravstveno varstvo (z izjemo onesnaževanja) - Vključuje RR - programe, ki so usmerjeni v varstvo in izboljšanje človekovega zdravja;
- g) družbeni razvoj in storitve - Vključuje RR, ki se nanaša na družbene in kulturne probleme;
- h) splošni napredek znanja - Ta skupina zajema RR, ki prispeva k splošnemu napredku znanja in ga ne moremo pripisati določenim ciljem;
- i) obramba - Vključuje RR, ki se v osnovi izvaja v vojaške namene, ne glede na njegovo vsebino, ali na možnost posredne civilne uporabe. Vključuje tudi varstvo (obrambo) pred naravnimi nesrečami.

² Označite lahko več odgovorov.

3.3. Kateri so **neposredni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Z razvojem in vpeljavo metod določanja kokcidiostatikov v različnih tkivih in substratih, predvsem v iztrebkih, je nam, inšpekcijskim službam, proizvajalcem krme in uporabnikom tovrstnih proizvodov omogočen celovit vpogled v uporabo, metabolizem in izločanje snovi, ki so sicer v intenzivni živinorejski proizvodnji še vedno nepogrešljivi dodatki krmi.

3.4. Kakšni so lahko **dolgoročni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

V preteklosti so se raziskovalci osredotočali predvsem na probleme uporabe kokcidiostatikov v preventivne in terapevtske namene pri živalih. Z našimi raziskavami smo se podali na področje polucije kokcidiostatikov v okolje in s tem posredne ogroženosti zdravja živali, predvsem pa ljudi.

3.5. Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- a) v domačih znanstvenih krogih;
- b) v mednarodnih znanstvenih krogih;
- c) pri domačih uporabnikih;
- d) pri mednarodnih uporabnikih.

3.6. Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?

Velik interes za tovrstno raziskovanje so že pokazali proizvajalci kokcidiostatikov, mešalnice krme in živinorejci; pričakujemo pa tudi odzive organizacij in inštitucij, ki se ukvarjajo z okoljsko problematiko.

3.7. Število diplomantov, magistrov in doktorjev, ki so zaključili študij z vključenostjo v raziskovalni projekt?

4. Sodelovanje z tujimi partnerji:

4.1. Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi inštitucijami.

4.2. Kakšni so rezultati tovrstnega sodelovanja?

5. Bibliografski rezultati³ :

Za vodjo projekta in ostale raziskovalce v projektni skupini priložite bibliografske izpise za obdobje zadnjih treh let iz COBISS-a) oz. za medicinske vede iz Inštituta za biomedicinsko informatiko. Na bibliografskih izpisih označite tista dela, ki so nastala v okviru pričujočega projekta.

6. Druge reference⁴ vodje projekta in ostalih raziskovalcev, ki izhajajo iz raziskovalnega projekta:

Vengušt A. Nadzor nad kakovostjo in zdravstveno ustreznostjo krme v Sloveniji. Krka v zdravstvenem varstvu perutnine, Novo mesto, 8. september 2006.

Vengušt A: Krmni dodatki v prehrani živali. Sestanek inšpekcije za kontrolo krme. Inšpektorat RS za kmetijstvo, gozdarstvo in hrano, Parmova 33, Ljubljana, 05. oktober 2006.

Vengušt A: Krma za domače živali. "Seminar: Izvajanje nadzora inšpekcijskih služb – veterinarski in zdravstveni nadzor", Carinska uprava RS, Šmartinska 55, 17. december 2007.

Tavčar Kalcher Gabrijela, Vengušt Anton, Zorman Rojs Olga, Bajc Zlatka, Ciglarič Renata: Lasalocid v jajcih in tkivih nesnic. 17. posvetovanje o prehrani domačih živali, "Zdravčevi- Erjavčevi dnevi". Radenci, 13. – 14. november 2008.

³ Bibliografijo raziskovalcev si lahko natisnete sami iz spletne strani: <http://www.izum.si/>

⁴ Navedite tudi druge raziskovalne rezultate iz obdobja financiranja vašega projekta, ki niso zajeti v bibliografske izpise, zlasti pa tiste, ki se nanašajo na prenos znanja in tehnologije.

Navedite tudi podatke o vseh javnih in drugih predstavitev projekta in njegovih rezultatov vključno s predstavitvami, ki so bile organizirane izključno za naročnika/naročnike projekta.