

Paweł MAŁAGOCKI¹, Magdalena GEMBAL¹, Joanna CEBULSKA¹
i Jadwiga PISKORSKA-PLISZCZYŃSKA¹

WYKORZYSTANIE PRZESIEWOWEJ METODY OZNACZANIA DIOKSYN W KRAJOWYM MONITORINGU PASZ W POLSCE

APPLICATION OF SCREENING METHOD FOR DIOXINS DETERMINATION IN FEED MONITORING PROGRAM IN POLAND

Abstrakt: Realizacja Planów Urzędowej Kontroli Pasz w krajach członkowskich UE jest jednym z elementów strategii „od pola do stołu” Komisji Europejskiej, mającej na celu zmniejszenie narażenia konsumentów na związki toksyczne ulegające kumulacji w łańcuchu pokarmowym. Plany zakładają kontrolę skażenia pasz związkami toksycznymi lub niepożądanymi. W Państwowym Instytucie Weterynaryjnym w Puławach wykonywane są od 2004 roku badania urzędowe zawartości polichlorowanych dibenzo-*p*-dioksyn (PCDD), polichlorowanych dibenzofuranów (PCDF) oraz dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (dl-PCB) w paszach. Badania wykonuje się, stosując dwie metody: przesiewową i potwierdzającą. Metoda przesiewowa stosuje do detekcji analitów genetycznie zmodyfikowaną linię komórkową (H1L6.1c3). Komórki tej linii odpowiadają na obecność dioksyn ekspresją genu reporterowego (lucyferazy) proporcjonalnie do ich stężenia. Pomiar aktywności lucyferazy względem krzywej kalibracyjnej 2,3,7,8-TCDD pozwala na półilościowe oznaczenie zawartości dioksyn w próbce. Próbkę o podwyższonej zawartości dioksyn (podejrzane, *suspected to be non-compliant*) przekazywane były do analizy potwierdzającej HRGC/HRMS. Dopuszczalne zawartości dioksyn (PCDD, PCDF i dl-PCB) w paszach określa Dyrektywa 2006/13/WE. Celem prezentowanej pracy była ocena użyteczności metody biotestu (metody stosującej zmodyfikowaną linię komórkową) jako narzędzia w monitoringu pasz. Metoda pozwoliła na preselekcję 100 próbek podejrzanych spośród 895 badanych. Metodą HRGC/HRMS potwierdzono przekroczenie dopuszczalnej zawartości analitów w 26 próbkach. Odsetek wyników fałszywie pozytywnych biotestu wynosił ok. 8%, nie stwierdzono wyników fałszywie negatywnych. Zastosowanie metody polegającej na zmodyfikowanych genetycznie linii komórkowej zmniejsza liczbę stosunkowo drogich analiz HRGC/HRMS, a zatem obniża koszt badań monitoringowych.

Słowa kluczowe: dioksyny, pasze, metoda przesiewowa, kontrola urzędowa

Dioksyny (*polichlorowane dibenzo-*p*-dioksyny* (PCDD) i *polichlorowane dibenzofurany* (PCDF)) należą do grupy trwałych zanieczyszczeń organicznych. Związki te powstają w wyniku spalania substancji organicznych przy niedoborze tlenu i w obecności chloru. Naturalnymi źródłami dioksyn są m.in. pożary lasów i wybuchy wulkanów, ale istnieją również antropogenne źródła dioksyn, takie jak: spalanie odpadów, przemysł metalurgiczny, czy synteza związków organicznych [1]. Objawami toksycznymi działania dioksyn na poziomie organizmalnym są m.in.: powiększenie wątroby, atrofia grasicy czy toksyczność reprodukcyjna [2]. Najbardziej toksyczna z dioksyn, 2,3,7,8-TCDD, jest uznana przez IARC za karcynogen I grupy [3]. Spośród 135 kongenerów PCDD i 75 kongenerów PCDF, różniących się liczbą i rozmieszczeniem atomów chloru w molekuale, odpowiednio położenia 7 i 10 ma zdolność do aktywacji wewnątrzkomórkowego *receptora węglowodorów aromatycznych* (AhR). Receptor po związaniu z ligandem staje się aktywnym czynnikiem transkrypcyjnym, powodując aktywację ekspresji wielu enzymów odpowiedzialnych za metabolizm ksenobiotyków i powstanie objawów toksycznych działania dioksyn [4]. Poznanie mechanizmu

¹ Zakład Radiobiologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny - PIB w Puławach, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, email: pawel.malagocki@piwet.pulawy.pl

molekularnego działania dioksyn przez receptor AhR umożliwiło opracowanie testów wykorzystujących linie komórkowe do półilościowej detekcji tych związków. Jednym z takich biotestów jest XDS-CALUX (*Xenobiotic Detection Systems, Inc.*), wykorzystujący genetycznie zmodyfikowaną linię komórkową hepatomy mysiej (H1L6.1c3). Do komórek wprowadzono plazmid zawierający gen reporterowy (lucyferazę świetlika) pod kontrolą promotora zależnego od AhR. Aktywacja receptora AhR przez dioksyny lub substancje pokrewne w takich komórkach powoduje, oprócz ekspresji enzymów odpowiedzialnych za metabolizm ksenobiotyków, ekspresję lucyferazy w sposób zależny od dawki [5].

Aby ograniczyć narażenie ludności na ksenobiotyki (m.in. dioksyny), Komisja Europejska przyjęła strategię „od pola do stołu” (*stable to table*) [6]. Jest ona realizowana przez kontrolę produkcji żywności na wszystkich etapach. Elementami tej kontroli są przepisy ustanawiające maksymalne dopuszczalne poziomy zanieczyszczeń w paszach i żywności, a także Krajowe Plany Urzędowej Kontroli Pasz realizowane w poszczególnych krajach członkowskich UE [7]. Monitoring dostarcza na bieżąco informacji dotyczących skażeń pasz, pozwala również w dłuższym horyzoncie czasowym ocenić stopień skażenia pasz, zidentyfikować potencjalnie niebezpieczne ich rodzaje. Liczba próbek kierowanych do badań monitoringowych jest rodzajem kompromisu pomiędzy zapewnieniem bezpieczeństwa konsumenta i uwarunkowaniami ekonomicznymi: im większa liczba wyników, tym pełniejszy obraz sytuacji toksykologicznej, a z drugiej strony - większy koszt programu. W celu obniżenia kosztów zaleca się stosowanie metod komplementarnych: przesiewowych, stosunkowo tanich i szybkich, mających na celu preselekcję spośród wielu próbek tych o podniesionym poziomie zanieczyszczeń (np. dioksyn), oraz metod potwierdzających, bardziej dokładnych, rozstrzygających, czy dana próbka przekracza dopuszczalną zawartość zanieczyszczeń [8].

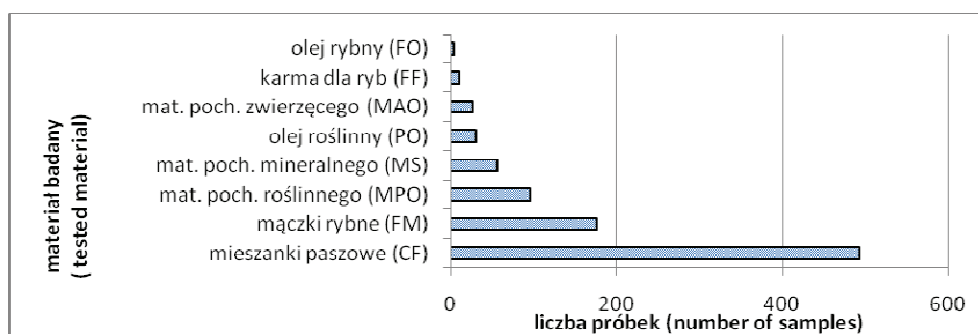
W Polsce badania monitoringowe pasz w kierunku zawartości dioksyn prowadzone są od 2004 roku w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym - Państwowym Instytucie Badawczym. Od 2008 roku do monitorowanych substancji dołączyły dioksynopodobne *polichlorowane bifenylole* (dl-PCB). W przedstawionej pracy oceniamy skuteczność metody przesiewowej (wspomniany biotest XDS-CALUX) w monitoringu zawartości PCDD i PCDF w paszach na podstawie wyników sześcioletnich badań.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły próbki pobrane zgodnie z Krajowymi Planami Urzędowej Kontroli Pasz w latach 2004-2009 przez Państwową Inspekcję Weterynaryjną. Podział materiału badanego na kategorie zgodnie z Dyrektywą 2006/13/WE przedstawiono na rysunku 1. Liczbę próbek analizowanych w poszczególnych latach przedstawia rysunek 2.

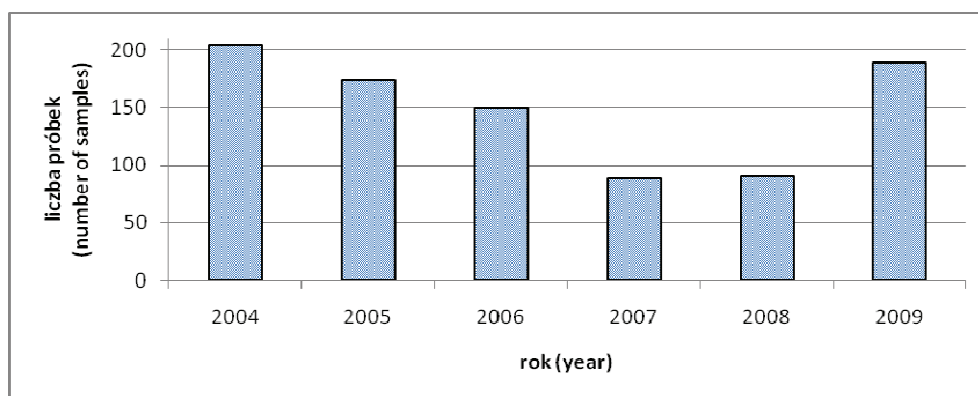
W badaniach zastosowano dwie metody komplementarne: przesiewową i potwierdzającą. Pierwsza z nich, biotest XDS-CALUX, jest półilościową metodą wykorzystującą do detekcji dioksyn i substancji pokrewnych zmodyfikowaną genetycznie linię komórkową H1L6.1c3. Jedyną metodą o statusie metody potwierdzającej w analizie dioksyn jest metoda instrumentalna HRGC/HRMS (*High-Resolution Gas Chromatography/High-Resolution Mass Spectrometry*) [8]. Próbkę o wynikach przekraczających maksymalną dopuszczalną zawartość dioksyn po analizie przesiewowej

(próbki podejrzane, *suspected samples*) analizowano metodą potwierdzającą HRGC/HRMS.



Rys. 1. Kategorie materiału badanego wg Dyrektywy 2006/13/WE [9]

Fig. 1. Materials categories according to Directive 2006/13/EC [9]. FO - fish oil, FF - feed for fish, MAO - material of animal origin, PO - plant oil, MS - mineral substance, MPO - material of plant origin, FM - fish meal, CF - compound feeds



Rys. 2. Liczba próbek pasz analizowanych w poszczególnych latach

Fig. 2. Number of samples analyzed between 2004-2009

Metoda przesiewowa. Ekstrakcja. Pierwszym etapem analizy jest ekstrakcja analitów z matrycy wraz z tłuszczem. Większość matryc po rozdrobnieniu była ekstrahowana trzykrotnie mieszaniną toluen:metanol 4:1 (v:v). Materiały paszowe pochodzenia mineralnego ekstrahowane były trzykrotnie toluenem w obecności acetonu. Tłuszcze paszowe rozpuszczane są w heksanie, roztwór przesączany jest przez bezwodny siarczan sodu. Wszystkie ekstrakty były zagęszczane do sucha, a następnie oznaczano zawartość tłuszczu w matrycy.

Oczyszczanie. Etap ten różni się w szczegółach w zależności od ilości wyekstrahowanego tłuszczu. Z ekstraktu, po rozpuszczeniu w heksanie, usuwa się tłuszcz i inne substancje interferujące w analizie przy użyciu kolumn z żelazem krzemionkowym,

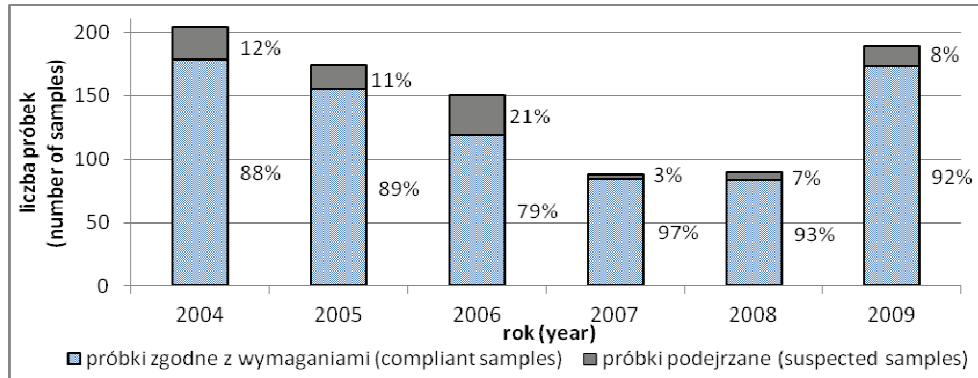
modyfikowanym kwasem siarkowym(VI) do stężenia 33 lub 44%. Eluat z kolumn z żelazem przenoszony jest na kolumny z mieszaniną węgiel aktywny:celit 1:99 (w:w). Z kolumn węglowych eluuje się dioksynopodobne PCB (mieszaniną heksan:toluen:octan etylu 8:1:1 v:v:v) oraz dioksyny (toluolem). Oczyszczone ekstrakty zagęszcza się do sucha.

Detekcja. Zawiesinę komórek linii H1L6.1c3 nanosi się na płytki 96-dółkowe. Po 16÷48 godzinach inkubacji oczyszczone ekstrakty rozpuszcza się w pożywce i nanosi na płytkę z komórkami. Na każdą płytkę nanosi się również serię rozcieńczeń standardu 2,3,7,8-TCDD o znanym stężeniu, służącego do wykreślenia krzywej kalibracyjnej. Po 20÷24 godzinach inkubacji przeprowadza się licząc komórek i oznacza aktywność lucyferazy w lizacie w obecności lucyferyny.

Metoda potwierdzająca. Jedyną metodą o statusie metody potwierdzającej w analizie dioksyn jest metoda chemiczna z zastosowaniem techniki rozcieńczeń izotopowych z detekcją HRGC/HRMS [8]. Badania zostały przeprowadzone w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym - PIB w Puławach, opis metody zawarto w [10].

Wyniki, ich omówienie i analiza

Skuteczność zastosowanego biotestu w preselekcji podejrzanych próbek pasz przedstawiono na rysunku 3. W latach 2004-2009 w ramach Krajowego Programu Urzędowej Kontroli Pasz przebadano 895 próbek w aspekcie zawartości dioksyn. Metoda przesiewowa umożliwiła preselekcję 100 próbek podejrzanych (11,2% badanych).



Rys. 3. Liczba próbek badanych w poszczególnych latach z podziałem na próbki zgodne z wymaganiami i próbki podejrzane [9]

Fig. 3. Results of feedstuffs analyzed by screening method, sorted to compliant and suspected to be non-compliant with regulation concerning maximal levels [9]

W poszczególnych latach odsetek próbek podejrzanych wynosił od 3 do 21% (rys. 5). Próbkę te poddano analizie chemiczną metodą potwierdzającą. W 26 (26% próbek podejrzanych) stwierdzono stężenia przekraczające maksymalne dopuszczalne poziomy (próbki niezgodne z wymaganiami, *non-compliant*). Pozostałe 74 próbki (74% podejrzanych) spełniały wymagania odnośnie do maksymalnych dopuszczalnych stężeń

(próbki zgodne z wymaganiami, *compliant*), stanowiły więc wyniki fałszywie pozytywne metody przesiewowej. Dzięki zastosowaniu chemicznej metody potwierdzającej ustalono odsetek wyników fałszywie pozytywnych metody przesiewowej. W puli wszystkich próbek badanych wyniósł on 8,3% (tab. 1, kol. 4).

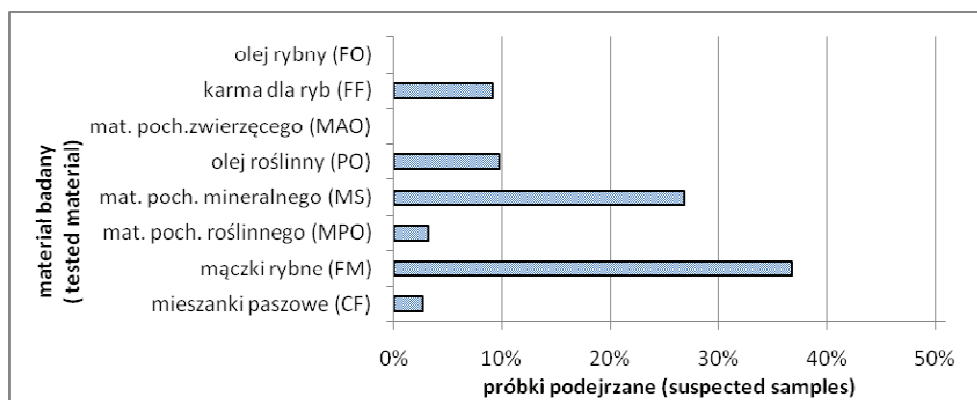
Tabela 1

Interpretacja wyników badań metody przesiewowej ze względu na zgodność stężenia oznaczonego w próbce z maksymalnymi dopuszczalnymi poziomami (ML)

Table 1

Results of screening method classified according to compliance with dioxin *maximal levels* (ML) obtained in six years monitoring program

Metoda przesiewowa	Metoda potwierdzająca	Interpretacja wyniku metody przesiewowej	Liczba próbek
1	2	3	4
wynik < ML (compliant)	wynik < ML (compliant)	negatywny	795 (88,8%)
	wynik > ML (non-compliant)	fałszywie negatywny	0 (0%)
wynik > ML (suspected)	wynik < ML (compliant)	falszywie pozytywny	74 (8,3%)
	wynik > ML (non-compliant)	pozytywny	26 (2,9%)
Razem			895 (100%)



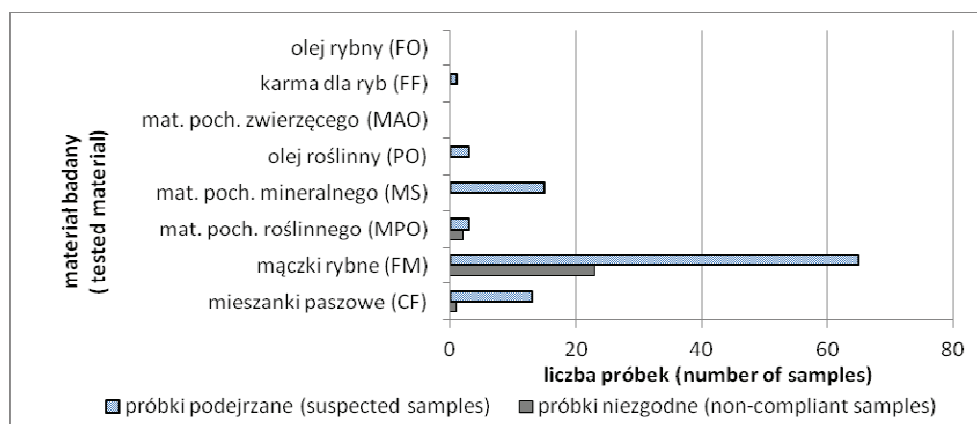
Rys. 4. Procentowy udział próbek podejrzanych w poszczególnych kategoriach paszowych

Fig. 4. Percent of suspected samples in different feed materials. FO - fish oil, FF - feed for fish, MAO - material of animal origin, PO - plant oil, MS - mineral substance, MPO - material of plant origin, FM - fish meal, CF - compound feeds

Największy odsetek próbek podejrzanych stwierdzono w kategorii mączek rybnych oraz materiałów paszowych pochodzenia mineralnego (rys. 4). Wśród mączek rybnych stwierdzono również największą liczbę próbek przekraczających dopuszczalną zawartość dioksyn (rys. 5), więc przypuszczalnie wyniki fałszywie pozytywne w tej grupie są

odbiciem stosunkowo wysokiego poziomu skażenia próbek. W przypadku substancji pochodzenia mineralnego, gdzie stosunkowo duża ilość próbek podejrzanych nie idzie w parze z potwierdzeniem przekroczenia, wyniki fałszywie negatywne świadczą prawdopodobnie o słabości procedury analitycznej. Komórki stosowane do detekcji w metodzie przesiewowej wykrywają wszystkie związki zdolne do aktywacji receptora AhR, nie wszystkie z tych związków są dioksynami. Specyficzność badania zapewniana jest na etapie oczyszczania próbek. Dlatego zbyt niski stopień oczyszczenia ekstraktów może wywoływać zwiększoną odpowiedź komórek i w konsekwencji powodować wyniki fałszywie pozytywne.

Większość próbek przekraczających dopuszczalną zawartość dioksyn należało do kategorii mączek rybnych (23 próbki). Poza tym stwierdzono przekroczenia w trzech próbkach: dwóch próbkach ziarna kukurydzy i jednej mieszance paszowej (rys. 5). Surowiec do produkcji krajowych mączek rybnych stanowią najczęściej ryby pochodzące z Morza Bałtyckiego, które jest dość silnie skażone dioksynami i dioksynopodobnymi PCB. Związki te ulegają kumulacji w organizmach żywych, co może wyjaśniać ich duże stężenia w mączkach rybnych. Zastosowanie ryb bałtyckich jako surowca w produkcji mączek niesie ze sobą ryzyko wprowadzenia dioksyn do łańcucha pokarmowego [11]. Skażenie próbek kukurydzy wynikało z nieprawidłowo przeprowadzonego procesu suszenia próbek i zanieczyszczenia ziarna spalinami, materiał pochodzenia roślinnego zawiera zwykle bardzo małe stężenia dioksyn. Jedno przekroczenie dopuszczalnej zawartości PCDD/PCDF w mieszankach paszowych na 493 przebadane próbki świadczy, że używane w Polsce mieszanki paszowe nie są dotknięte problemem skażenia tymi substancjami. Skażenie mogło wynikać z zastosowania do produkcji mieszanki skażonego komponentu paszowego.



Rys. 5. Próbki podejrzane oraz niezgodne z wymaganiami z podziałem na kategorie materiałów paszowych

Fig. 5. Number of suspected and non-compliant results in different feed materials. FO - fish oil, FF - feed for fish, MAO - material of animal origin, PO - plant oil, MS - mineral substance, MPO - material of plant origin, FM - fish meal, CF - compound feeds

Metody przesiewowe obarczone są wadami. Zaliczyć do nich można m.in. obecność wyników fałszywie pozytywnych. Jednak z punktu widzenia bezpieczeństwa żywności, groźniejsze jest przeoczenie próbki skażonej niż niewielki wzrost kosztów wynikający ze zwiększenia liczby analiz potwierdzających. Dlatego metody przesiewowe projektowane są w taki sposób, aby zminimalizować ryzyko wystąpienia wyników fałszywie negatywnych ewentualnym kosztem zwiększenia liczby wyników fałszywie pozytywnych. Zgodnie z rozporządzeniem, ustanawiającym metody pobierania próbek i metody analizy do celów urzędowej kontroli dioksyn i dioksynopodobnych *polichlorowanych bifenyli* (PCB) w środkach spożywczych, metody przesiewowe powinny stanowić stosunkowo szybką i tanią metodę preselekcji próbek skażonych [8]. Liczba wyników fałszywie pozytywnych metody przesiewowej (a w konsekwencji analiz potwierdzających) powinna być dostatecznie mała, by uzasadniać ekonomicznie jej zastosowanie. Warunek ten został spełniony, ponieważ uzyskano 8,3% wyników fałszywie pozytywnych. Ten sam akt prawny ustanawia maksymalny dopuszczalny udział wyników fałszywie negatywnych na < 1% [8]. W tym celu, w ramach sterowania jakością, metodą potwierdzającą przebadano co 10 próbkę uznaną w bioteście za zgodną z wymaganiami (łącznie ok. 90 próbek). Nie stwierdzono żadnego wyniku fałszywie negatywnego. Metoda przesiewowa korzystająca ze zmodyfikowanej linii komórkowej pozwoliła na redukcję liczby trzykrotnie droższych analiz potwierdzających z 895 do ok. 190, co uzasadnia ekonomicznie jej zastosowanie. Brak wyników fałszywie negatywnych pozwala na uznanie jej za bardzo przydatne narzędzie do badań monitoringowych pasz i komponentów paszowych.

Wnioski

1. Zastosowanie metody przesiewowej pozwoliło na zmniejszenie liczby analiz potwierdzających o 79%, obniżyć koszty Krajowego Programu Urzędowej Kontroli Pasz.
2. Brak wyników fałszywie negatywnych w metodzie przesiewowej świadczy o jej przydatności do badań urzędowych.

Podziękowania

Autorzy dziękują zespołowi w składzie: Radosław Lizak, Sebastian Maszewski, Małgorzata Warenik-Bany i Halina Dudek, Marianna Gawrońska za wykonanie oznaczeń zawartości dioksyn w paszach metodą potwierdzającą.

Literatura

- [1] US EPA 2006. EPA/600/P-03/002F. (<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=159286>).
- [2] Piskorska-Pliszczyńska J.: *Medycyna Wet.*, 1996, **52**, 94-98.
- [3] IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks. Hum., 1997, **69**, 1-15.
- [4] Poland A. i Knutson J.C.: *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1982, **22**, 517-554.
- [5] Murk A.J., Legler J., Denison M.S., Giesy P., van de Guchte C. i Brouwer A.: *Fund. Appl. Toxicol.* 1996, **33**, 149-160.
- [6] COM(2001)593 z dnia 24 października 2001, OJ C 322, 2-18.
- [7] Roczne Plany Urzędowej Kontroli Pasz, (http://www.wetgiw.gov.pl/index.php?action=szczegoly&m_id=31&kat_id=1748)
- [8] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 152/2009 z dnia 27 stycznia 2009 r., DzU L 54, 1-130.
- [9] Dyrektywa Komisji (WE) nr 2006/13/WE z dnia 3 lutego 2006 r., DzU L 32, 44-53.

- [10] Maszewski S., Lizak R., Warenik-Bany M. i Piskorska-Pliszczyńska J.: Mat. Konf. Farmakologiczne i toksykologiczne aspekty działania ksenobiotyków. Wyd. Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, Olsztyn 2010, 121-128.
- [11] Piskorska-Pliszczyńska J., Lizak R., Maszewski S., Małagocki P. i Wijaszka T.: Bull. Vet. Inst. Pulawy, 2009, **53**, 825-831.

APPLICATION OF SCREENING METHOD FOR DIOXINS DETERMINATION IN FEED MONITORING PROGRAM IN POLAND

Radiobiology Department, National Veterinary Research Institute, Pulawy

Abstract: The implementation of The European Commission strategy “from farm to fork” includes the Plans of Feed Official Control preparation and realization in member states. The plans involve a regular control of feedstuff contamination with toxic or undesirable substances. In Poland, the feed official control of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD), polychlorinated dibenzofurans (PCDF) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (dl-PCB) has been conducted in The National Veterinary Research Institute in Pulawy since 2004. Dioxin monitoring in feedstuffs was performed using screening and confirmatory methods. The screening method was based on genetically modified cell line (H1L6.1c3). Cells respond to dioxins presence by expression of reporter gene (luciferase) in concentration-dependent manner. Measurement of luciferase activity and 2,3,7,8-TCDD standard curve allow a semi-quantitative determination of dioxin content in sample extract; samples suspected to be non-compliant with regulation 2006/13/EC were confirmed by the HRGC-HRMS. The aim of the presented study was to evaluate the usefulness of a cell-based method as a screening tool in feed monitoring. This method allowed us to distinguish 100 out of 895 feed samples with dioxin concentration over the permitted level (suspected to be non-compliant). Of the 100 samples, 26 were confirmed by the HRGC/HRMS method to be non-compliant with Directive 2006/13/EC. About 8% of the results obtained by the cell-based method were false positive according to HRGC/HRMS analysis. No false negative screening results were found. The use of the cell-based screening method decreases the number of HRGC/HRMS analysis and consequently lowers the total cost of the dioxins monitoring program.

Keywords: dioxins, feedstuffs, screening method, official control