

Beata FURGA¹, Magdalena GEMBAL¹, Joanna CEBULSKA¹, Paweł MAŁAGOCKI¹
Jadwiga PISKORSKA-PLISZCZYŃSKA¹ i Sebastian MASZEWSKI¹

ZASTOSOWANIE METODY PRZESIEWOWEJ OZNACZANIA DIOKSYN W SYTUACJACH KRYZYSOWYCH

APPLICATION OF SCREENING METHOD FOR DIOXIN DETERMINATION IN CRISIS SITUATIONS

Abstrakt: Dioksyny i dioksynopodobne PCB były źródłem wielu różnych awarii i katastrof ekologicznych oraz skażeń żywności i pasz na świecie. W Europie do najbardziej znanych i brzemiennej w skutkach należy katastrofa ekologiczna w 1976 roku w Seveso (Włochy). Innym przykładem awarii było skażenie mleka, jaj i tłuszczu zwierząt wypasanych na farmach w pobliżu spalarni komunalnych emitujących do środowiska duże ilości tych związków, skażenie mleka krów w wyniku pobierania dioksyn wraz z zanieczyszczoną pulpą cytrusową oraz największa katastrofa, która wystąpiła w Belgii i Europie (1999 rok) w wyniku dodania do pasz 200 litrów oleju skażonego PCB i dioksynami. Powyższe wydarzenia, jak również podjęta przez Wspólnotę Europejską strategia ochrony zdrowia mieszkańców przed szkodliwym działaniem dioksyn zawartych w żywności (ponad 90% dioksyn pobieranych jest wraz z żywnością), ujawniły potrzebę posiadania szybkich metod skryningowych do monitorowania na szeroką skalę żywności i pasz. Dla określenia aktywności biologicznej obecnych w paszy PCDD, PCDF i dl-PCB w opracowanych metodach przesiewowych wykorzystano ekspresję genu reporterowego, aktywność enzymów mikrosomalnych, wiązanie ligandu do receptora i przeciwciał. Obecnie biotest CALUX (ekspresja genu reporterowego) uznawany jest za najlepszą metodę przesiewowego oznaczania dioksyn i dl-PCB w żywności i paszach oraz jest jedynym testem stosowanym w rutynowych badaniach monitoringowych oraz sytuacjach kryzysowych. W pracy przedstawiono rezultaty stosowania metody przesiewowej, bazującej na genetycznie modyfikowanych komórkach hepatomy mysiej, wrażliwych na dioksyny. Podczas incydentów dioksynowych w naszym kraju z metody tej korzystano w badaniach żywności pochodzenia zwierzęcego i roślinnego (mięso i jego przetwory, mleko i produkty mleczne, pasze i składniki paszowe). Zastosowanie metody przesiewowej oznaczania dioksyn umożliwiło szybką selekcję próbek dodatnich i zwiększenie przepustowości laboratorium, co jest istotne w sytuacjach kryzysowych dla skrócenia czasu oczekiwania na wynik. W sytuacjach kryzysowych dotyczących skażenia dioksynami potwierdzono, że szybka metoda przesiewowa jest ważnym narzędziem w ocenie i zarządzaniu ryzykiem oraz bezpieczeństwem żywności.

Słowa kluczowe: dioksyny, metoda przesiewowa, sytuacje kryzysowe

Wprowadzenie

Dioksyny i PCB, ze względu na właściwości toksyczne (immunosupresja, zaburzenia hormonalne, kancerogenność), podlegają rygorystycznemu ustawodawstwu we wszystkich krajach Unii Europejskiej. Dopuszczalne limity tych związków w żywności i paszach zostały ustalone kolejnymi rozporządzeniami Parlamentu Europejskiego i Komisji Europejskiej [1, 2]. Obowiązująca od 2001 r. strategia UE dotycząca dioksyn, której celem jest obniżenie narażenia populacji europejskiej na dioksyny, prowadzi do ograniczenia występowania tych związków w paszach i produktach spożywczych. Kontrola zawartości dioksyn zarówno w surowcach, półproduktach, jak i gotowych artykułach spożywczych

¹ Zakład Radiobiologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, tel. 81 889 33 52, fax 81 886 25 95, email: nvriddioxin@piwet.pulawy.pl, beata.furga@piwet.pulawy.pl, magdalena.gemba1@piwet.pulawy.pl, asia.cebulska@piwet.pulawy.pl, pawel.malagocki@piwet.pulawy.pl, jagoda@piwet.pulawy.pl, sebastian.maszewski@piwet.pulawy.pl

i paszowych przyczynia się do zwiększenia bezpieczeństwa konsumentów poprzez eliminację dioksyn z diety [3].

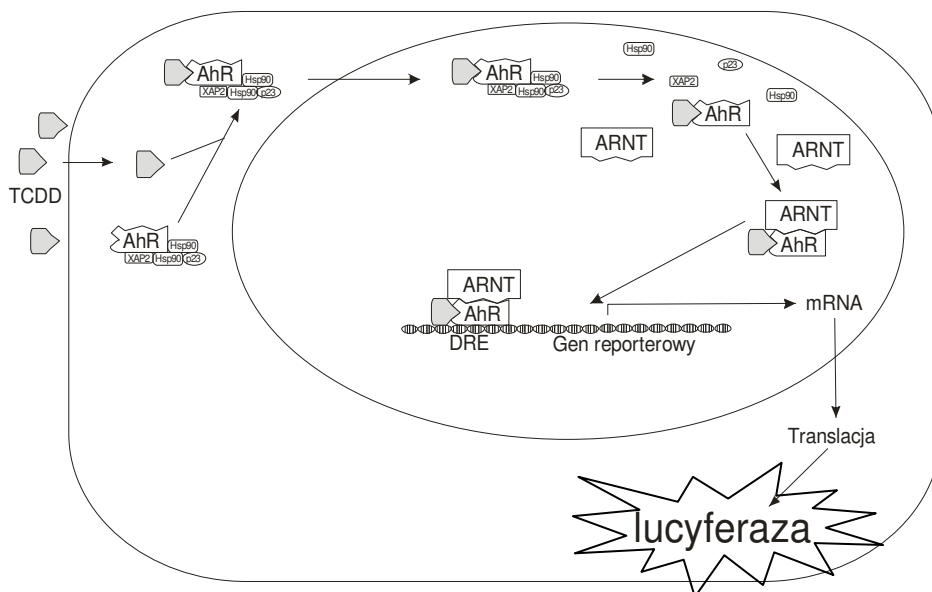
Żywność pochodzenia zwierzęcego stanowi główne źródło dioksyn dla człowieka i dlatego jej poświęca się największą uwagę. W sytuacjach kryzysowych, które w ostatnich 40 latach wielokrotnie notowano (katastrofa ekologiczna w 1976 roku w Seveso (Włochy) [4, 5], masowe skażenia na farmach świń (Montana, USA, 1979 roku), katastrofa w Belgii w 1999 roku, skażenia mleka, jaj i tłuszczu zwierząt wypasanych na farmach w pobliżu spalarni komunalnych emitujących duże ilości dioksyn), bardzo przydatnym narzędziem administracji odpowiedzialnej za bezpieczeństwo żywności stały się wstępne metody przesiewowe badania żywności [6]. Do nich należy biotest, bazujący na genetycznie zmodyfikowanych komórkach hepatomy mysiej, cechujący się wysoką czułością i niższymi kosztami badania, w stosunku do instrumentalnej metody HRGC-HRMS. Obecnie biotest CALUX uznawany jest za najlepszy test biologiczny skryningowego oznaczania dioksyn i dl-PCB w żywności i paszach i jest jedynym testem stosowanym w rutynowych badaniach monitoringowych pasz. W sytuacjach kryzysowych służy również do badania żywności.

Celem pracy była ocena przydatności metody przesiewowej oznaczania dioksyn z zastosowaniem genetycznie modyfikowanej linii komórkowej w sytuacji kryzysowej i zwiększonego ryzyka w roku 2011 w związku z koniecznością badania eksportowanych produktów żywnościowych na Ukrainę.

Materiał i metody

Materiał. Głównym materiałem badawczym były próbki: tkanki mięśniowej i wątroby zwierząt hodowlanych (drób i trzoda chlewna) oraz jaj, mleka i przetworów mlecznych, w których podejrzewano występowanie dioksyn i PCB w stężeniach przekraczających dopuszczalną zawartość.

Metody. Metoda przesiewowa składa się z części chemicznej i biologicznej. Część chemiczna obejmuje ekstrakcję dioksyn i dl-PCB z próbki rozpuszczalnikami organicznymi wraz z frakcją lipidową. Po zagęszczeniu ekstrakt oczyszcza się na kolumnie chromatograficznej z żelom krzemionkowym modyfikowanym kwasem siarkowym oraz na kolumnie węglowej (XCARB), która wiąże badane związki. Oddzielenie frakcji zawierającej PCDD i PCDF od frakcji zawierającej dl-PCB następuje na kolumnie węglowej poprzez wymywanie odpowiednimi rozpuszczalnikami. Po odparowaniu eluaty poddaje się badaniu na zawartość PCDD/PCDF i dl-PCB. Do detekcji i oznaczania półilościowego badanych związków służy biotest CALUX. Test bioanalityczny przeprowadza się na genetycznie zmodyfikowanych komórkach hepatomy mysiej. Bazuje on na poznanym molekularnym mechanizmie działania dioksyn i związków pokrewnych, tj. chemicznej aktywacji wewnątrzkomórkowego receptora Ah (AhR). AhR jest czynnikiem transkrypcji genów, który aktywowany przez dioksyny wiąże się do DNA i zapoczątkowuje ekspresję szeregu genów (rys. 1). Pomiar poziomu aktywacji receptora Ah przez dioksyny i związki pokrewne obecne w ekstraktach z badanych próbek pozwala na ustalenie potencjału toksycznego tych próbek, wyrażonego w równoważnikach toksyczności WHO-TEQ [7]. Wykrywalność metody wynosi 0,2 pg/g, a odzyski są na poziomie 60-85%.



Rys. 1. Schemat mechanizmu działania biotestu CALUX

Fig. 1. Diagram of CALUX bioassay action

Wyniki

Spośród 284 próbek pochodzenia zwierzęcego analizowanych opisaną metodą przesiewową tylko 22 próbki (co stanowi 8%) uznano za „podejrzane”, ponieważ zawarte w nich dioksyny przekraczały ustaloną prawem dopuszczalną zawartość. Badania potwierdzające wykonano zgodnie z wymaganiami rozporządzeń unijnych, tj. metodą HRGC-HRMS (tab. 1) [1].

Tabela 1

Próbki wątpliwe po analizie metoda przesiewową i potwierdzającą. Wyniki podano w pg WHO-TEQ/g tł.

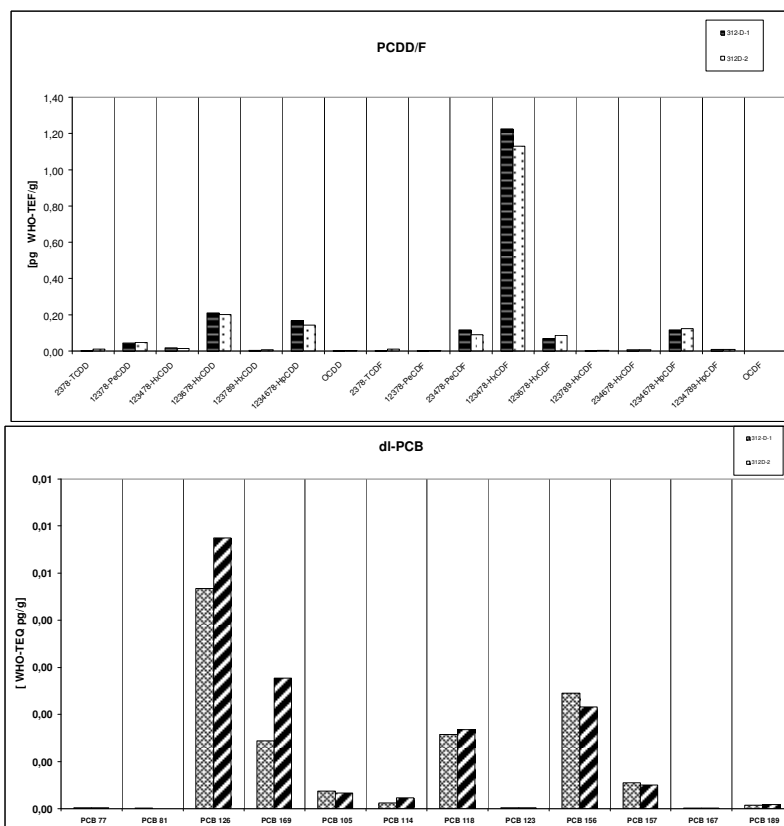
Table 1

Suspect samples after the screening and confirmatory method (in pg WHO-TEQ/g fat)

Lp.	Nr próbki	Rodzaj matrycy	PCDD/F	Limit PCDD/F	dl-PCB	Suma	Limit PCDD/F/dl-PCB	Wyniki HRGC-HRMS		
								PCDD/F	dl-PCB	Suma
1	289/D	ogonówka parzona wędzona	0,51	1,00	4,93	5,44	1,50	0,25	0,14	0,39
2	293/D	boczek wieprzowy	0,28		3,38	3,66		0,23	0,12	0,35
3	362/D	póltusze wieprzowe	2,8		1,29	4,09		0,03	0,3	0,33
4	405/D	mięso wieprzowe	1,8		2,61	4,41		0,46	0,13	0,59

Lp.	Nr próbki	Rodzaj matrycy	PCDD/F	Limit PCDD/F	dl-PCB	Suma	Limit PCDD/F/dl-PCB	Wyniki HRGC-HRMS		
								PCDD/F	dl-PCB	Suma
5	406/D	mięso wieprzowe	0,52	2,00	1,28	1,8	4,00	0,23	0,13	0,36
6	549/D	szynka wieprzowa	1,97		2,23	4,2		0,2	0,14	0,34
7	554/D	podgardle wieprzowe	3,45		0,52	3,97		0,2	0,13	0,33
8	557/D	skórki wieprzowe	3,59		0,49	4,08		0,2	0,2	0,4
9	576/D	podgardle wędzone	5,69		0,28	5,97		0,84	0,15	0,99
10	594/D	konserwa tyrolska	1,22		0,21	1,43		0,23	0,14	0,37
11	209/D	mięśnie kurczaka	1,36		2,00	1,56		2,92	4,00	0,67
12	360/D	mięso drobiowe	6,71	6,85		13,56	0,23	0,28		0,51
13	421/D	MOM drobiowe	1,1	2,46		3,56	0,26	0,4		0,73
14	254/D	wątroba wołowa	7,53	6,00	2,11	9,64	12,00	3,55	1,02	4,57
15	202/D	mleko spożywcze	2,42	3,00	2,93	5,35	6,00	0,72	0,45	1,17
16	312/D	tłuszcz twardy mrożony	3,39	1,00	0,5	3,89	1,50	2	0,12	2,12
17	313/D	tłuszcz twardy mrożony	1,26		0,53	1,79		0,43	0,12	0,55
18	351/D	tłuszcz twardy ekstra	1,36		2,28	3,64		0,2	0,13	0,33
19	481/D	słonina mrożona	0,49		1,00	1,49		0,2	0,12	0,32
20	555/D	tłuszcz wieprzowy	4,09		0,48	4,57		0,2	0,12	0,32
21	556/D	tłuszcz wieprzowy	4,42		0,94	5,36		0,2	0,12	0,32
22	571/D	słonina wieprzowa	3,65		0,35	4,00		0,28	0,12	0,4

Metodą HRGC-HRMS potwierdzono stężenie przekraczające dopuszczalne limity tylko w 1 próbce tłuszczu wieprzowego, które wynosiło odpowiednio dla PCDD/PCDF 2,00 pg WHO-TEQ/g tłuszczu, natomiast dla PCDD/PCDF/dl-PCB 2,12 pg WHO-TEQ/g tłuszczu. O toksyczności badanej próbki przesądziła przede wszystkim obecność 1,2,3,4,7,8-HxCDF (rys. 2). Średnią zawartość i zakres stężeń dla różnych matryc żywności przedstawiono w tabeli 2.



Rys. 2. Profil kongenerów PCDD, PCDF, dl-PCB w tłuszczu wieprzowym. Badania wykonano w dwóch powtórzeniach

Fig. 2. PCDD, PCDF, dl-PCBs profile in pork fat. The tests were performed in duplicate

Tabela 2

Średnia zawartość PCDD, PCDF i dl-PCB (w pg WHO-TEQ/ g tł.)

Table 2

The average contents of PCDDs, PCDFs and dl-PCB (in pg WHO-TEQ/g fat)

Rodzaj próbki		PCDD/PCDF	dl-PCB	PCDD/PCDF/dl-PCB
mięso świni <i>n</i> = 96	średnia ±odch. std.	0,45±0,81	0,53±0,66	0,98±1,13
	zakres	0,05-5,69	0,07-4,93	0,12-5,97
mięso drobiu <i>n</i> = 36	średnia ±odch. std.	0,66±1,11	0,73±1,16	1,39±2,22
	zakres	0,07-6,71	0,10-6,85	0,18-13,56
wątroba <i>n</i> = 11	średnia ±odch. std.	2,43±2,05	2,98±1,46	5,41±2,13
	zakres	0,62-7,53	1,10-5,05	2,64-9,64

Rodzaj próbki		PCDD/PCDF	dl-PCB	PCDD/PCDF/dl-PCB
mleko i produkty mleczne n = 87	średnia ±odch. std.	0,84±0,67	0,60±0,53	1,44±1,08
	zakres	0,05-2,42	0,05-2,93	0,10-5,35
tłuszcz świń n = 54	średnia ±odch. std.	0,55±0,99	0,43±0,32	0,98±1,13
	zakres	0,04-4,42	0,10-2,28	0,19-5,36

Omówienie i wnioski

Metody przesiewowe służą do wstępnej selekcji próbek, w których mogą być badane obecne związki. Również zastosowany w tych badaniach biotest CALUX oddziela próbki negatywne od tych, które budzą podejrzenia o przekroczeniu limitów dopuszczalnych. W próbkach tych, które stanowiły zaledwie 8% badanych, dopiero metoda identyfikacji i oznaczania ilościowego HRGC-HRMS pozwoliła na jednoznaczną ocenę zgodności badanej próbki z normą.

Zastosowana w tych badaniach podczas sytuacji kryzysowej metoda, w której należało określić poziom dioksyn, furanów i dl-PCB, stosunkowo szybko odrzuciła próbki negatywne, zaś w pozostałych badaniach wykorzystano czasochłonną i kosztowną metodę potwierdzającą. Zastosowanie metody przesiewowej znacząco obniżyło koszty całkowite badań wszystkich 284 próbek, zwiększyło przepustowość laboratorium, co jest szczególnie istotne w sytuacji kryzysowej dla skrócenia czasu oczekiwania na wynik. Właśnie w sytuacjach kryzysowych dotyczących szybkiego potwierdzenia lub odrzucenia opinii o stwierdzeniu skażenia żywności dioksynami kolejny raz potwierdzono, że szybka metoda przesiewowa jest ważnym narzędziem w ocenie próbek podejrzanych i zarządzaniu ryzykiem oraz w bezpieczeństwie żywności.

Literatura

- [1] Commission Regulation (EU) No 1259/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffs. DzU UE 2011,L320/18-23.
- [2] Commission Regulation (EU) No 277/2012 of 28 March 2012 amending Annexes I and II to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels and action thresholds for dioxins and polychlorinated biphenyls. DzU UE 2012, L 91/1-7.
- [3] Communication from the Commission to the Council, the European Parliament and the Economic and Social Committee on a Community Strategy for Dioxins, Furans and Polychlorinated Biphenyls (COM (2001) 593). DzU WE 2002, C322, 2-18.
- [4] Needham LL, Gerthoux PM, Patterson DG, Jr, Brambilla P, Smith SJ, Sampson EJ, et al. Environ Res. 1999;80:200-206. DOI: 10.1006/enrs.1998.3928.
- [5] Landi MT, Needham LL, Lucier G, Mocarelli P, Bertazzi PA, Caporaso N. Lancet. 1997;349(9068):1811. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)24025-0.
- [6] Bernard A, Broeckeaert F, De Poorter G, Hermans C, Saegerman C, Houins G. Environ Res. 2002;88(1):1-18. DOI: 10.1006/enrs.2001.4274.
- [7] Piskorska-Pliszczyńska J, Małagocki P, Stypuła-Trębas S. Wybrane biologiczne metody analizy dioksyn. Kryteria wykonawcze testu CALUX w paszach. W: Dioksyny w przemyśle i środowisku. Kraków: Politechnika Krakowska; 2005.

APPLICATION OF SCREENING METHOD FOR DIOXIN DETERMINATION IN CRISIS SITUATIONS

National Veterinary Research Institute - State Research Institute, Department of Radiobiology, Pulawy

Abstract: Dioxins and dioxin-like compounds have caused numerous ecological disasters and contamination of food and feed. In Europe, the most famous and fateful environmental disasters was the Seveso accident (Italy) in 1976. Another example was the contamination of milk, eggs and fat of animals grazing on farms near municipal waste incinerators emitting into the environment large amounts of these compounds, contamination of the milk of cows as a result of feeding citrus pulp contaminated with dioxin, and the biggest catastrophe that has occurred in Belgium and in Europe (1999) by adding to feed 200 dm³ of PCB and dioxin contaminated oil. These events, as well as taken by the European Community strategy for health protection of inhabitants from the harmful effects of dioxins in food (more than 90% of dioxin comes from the food), revealed a need for a rapid screening methods for monitoring food and feedstuffs at a large scale. To determine the biological activity of PCDD, PCDF and dl-PCBs present in the feed, developed screening methods use the expression of reporter gene, activity of microsomal enzymes, the binding of ligand to the receptor and to antibody. At present, bioassay CALUX (reporter gene expression) is considered to be the best screening test for determination of dioxins and dl-PCBs in food and feed, and it is the only test used in routine monitoring and in the crisis situations. The paper presents the results of a screening method application based on genetically engineered murine hepatomy cell line, sensitive to dioxins. This method was used to determine dioxins in food of animal and plant origin (meat and its products, milk and milk products, feedstuffs and feedstuff components) during dioxin crises. Application of the screening test allowed rapid selection of positive samples, increase laboratory throughput, and shorten waiting time for results. Shortening the waiting time for results is important in crisis situations. Rapid screening method is an important tool in assessing and managing risk and food safety in emergency situations on the dioxin contamination.

Keywords: dioxin, screening method, crisis situations

