

ZAKLJUČNO POROČILO

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

I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta

REPUBLIKA SLOVENIJA
POSILEC JAVNEGA POSREDOVANJA
JAVNA AGENCIJA ZA RAZISKOVNE DEJAVNOSTI
REPUBLIKE SLOVENIJE

1. Naziv težišča v okviru CRP:

Povezovanje ukrepov za doseganje trajnostnega razvoja

Prejeto: 14-09-2010

025

2. Šifra projekta:

V4-0526

Številka zadeve: 63113-130 | 1008
13

3. Naslov projekta:

Kvantitativna validacija potrditvenih metod za določanje tetraciklinov in beta-laktamov

3. Naslov projekta

3.1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

Kvantitativna validacija potrditvenih metod za določanje tetraciklinov in beta-laktamov

3.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:

Quantitative validation of confirmation methods for determination of tetracyclines and beta-lactams

4. Ključne besede projekta

4.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:

veterinarska zdravila, živila živalskega izvora, tetraciklini, beta-laktami, validacija, LC-MS/MS, HPLC-UV-VIS

4.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:

veterinary drugs, food of animal origin, tetracyclines, beta-lactams, validation, LC-MS/MS, HPLC-UV-VIS

5. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

Univerza v Ljubljani (0406 Veterinarska fakulteta)

5.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

6. Sofinancer/sofinancerji:

MKGP

7. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

8110

Prof. dr. Ksenija Šinigoj Gačnik

Datum: 10.9.2010

Podpis vodje projekta:

Prof. dr. Ksenija Šinigoj Gačnik

K. Šinigoj

Podpis in žig izvajalca:

Rektor: Prof. dr. Radovan Stanislav
Pejovnik

Po pooblastilu

Dekan: prof. dr. Marjan Kosec

M. Kosec



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.

Cilje, ki smo si jih zastavili v zvezi z beta laktami, nismo uspeli uresničiti v celoti. Ker so starejše kromatografske metode z uporabo HPLC v kombinaciji z UV-detektorjem zahtevnejše in zamudnejše glede priprave vzorcev (ekstrakcija, čiščenje ekstraktov, koncentriranje), poleg tega zahtevajo predkolonsko derivatizacijo s toksičnim živosrebrovim kloridom, smo se odločili za novejši LC-MS/MS postopek. V multimetodo, ki jo še razvijamo, želimo vključiti vse registrirane beta laktame. To je vzrok, da še nismo pripravili standardnega operativnega postopka (SOP).

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

- ☒ a) da
☐ b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

Dodatno smo validirali dve presejalni metodi in sicer za določanje prisotnosti tetraciklinov v medu in za določanje prisotnosti tetraciklinov in beta-laktamov v mleku. Validacija je bila nujno potrebna za dokazovanje ustreznosti obeh metod glede na predpisane MRL-vrednosti.

2. Vsebinsko poročilo o realizaciji predloženega programa dela¹:

Zahteve, ki smo si jih postavili pri razvoju potrditvene metode določanja ostankov tetraciklinov v živilih živalskega izvora, so bile na eni strani čim večja občutljivost in na drugi strani čim širše delovno območje. Pri določanju ostankov v živilih, ki izvirajo iz živali, pri katerih uporaba tetraciklinov ni dovoljena, je mogoče uporabljati samo metode z visoko občutljivostjo, ki omogočajo določanje nizkih koncentracij ostankov veterinarskih zdravil. Primer takega živila je med. Zaradi živil, ki izvirajo iz živali, pri katerih je uporaba tetraciklinov dovoljena in imajo določene maksimalne dovoljene vrednosti (MRL), kot na primer mleko, pa mora biti metoda uporabna tudi za določanje visokih koncentracij ostankov zdravil. Metoda, ki omogoča doseganje zastavljenih zahtev je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti v povezavi z masnim detektorjem (LC-MS/MS). Zato smo skladno s planom optimizirati kromatografske pogoje ločbe in pogoje detekcije štirih tetraciklinov: tetraciklin (TC), oksitetraciklin (OTC), klortetraciklin (CTC) in doksiciklin (DC).

Glede na končni cilj, ki smo si ga zastavili, da bo razvita metoda primerna za kvantitativno delo, smo na osnovi literaturnih objav izbrali interni standard demeklociklin, ki nam je omogočil vrednotenje rezultatov.

Uvedeni in optimizirani postopek določanja tetraciklinov v medu smo preiskusili na različnih vrstah medu (akacijev, gozdni, cvetlični). Opravili smo vrsto poskusov ponovljivosti in ugotovili velik vpliv vrste medu na dobljeni kvantitativni rezultat. Vpliv se kaže na absolutnih površinah (višinah) kromatografskih vrhov internega standarda (demeklociklin), s katerim vrednotimo količino tetraciklinov v medu. Posledice so napačni kvantitativni rezultati za vse štiri preizkušane učinkovine. Problem je možno rešiti samo s pripravo umeritvene krivulje v posameznih vzorcih po metodi standardnega dodatka. Metoda zahteva dovolj veliko količino preizkuševanega vzorca, saj ga moramo že v začetku razdeliti na vsaj pet delov (pet nateht po 6 g, za realnost rezultatov je potrebno pripraviti vsaj tri točke umeritvene krivulje po sistemu brez dodatka, dodatek "a", "2a" in "3a"). Da je pristop pravilen, smo se prepričali s sodelovanjem v medlaboratorijski preiskuševalni shemi FAPAS, kjer smo pravilno identificirali oba prisotna tetraciklina v medu in sicer DC in OTC. Poleg tega smo pravilno ovrednotili koncentraciji. Doseženi z-vrednosti sta znašali 0,5 za DC in 0,2 za OTC (zadovoljivi rezultati imajo z-vrednosti med -2 in +2).

Vzporedno s kemijsko metodo (LC/MS/MS) smo vpeljali tudi encimatsko metodo določanja tetraciklinov v medu z uporabo ELISA Ridacsreen komercialnega testa proizvajalca R-Biopharm. Pripravili smo standardni operativni postopek (SOP 375) in metodo validirali skladno z zahtevami za presejalne metode in je bila akreditirana v letu 2009.

Podobno kot pri razvoju metode za določanje ostankov tetraciklinov v medu smo tudi pri mleku optimiziran postopek preskusili s sodelovanjem v medlaboratorijski preskuševalni shemi, ki jo je organiziral evropski referenčni laboratorij (CRL) za ostanke antibiotikov AFSSA (Study code: 09-ZU). Rezultati so bili dobri. Pravilno smo identificirali OTC v

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.

dveh od sedmih vzorcev na različnih koncentracijskih nivojih, kjer je bil eden pod drugi pa je presegel MRL vrednost. Doseženi z-vrednosti sta znašali -0,4 in -0,31. Celotna metoda (ekstrakcija, čiščenje ekstraktov, koncentriranje in kvantitativno vrednotenje z uporabo internega standarda) se je pokazala kot ustrezna, zato smo pripravili standardni operativni postopek (SOP 298). V nadaljevanju smo metodo določitve teraciklinov v mleku z LC-MS/MS na nivoju potrditve validirali skladno z obstoječo zakonodajo (EC/2002/657). Vpliv matriksa pri mleku je bistveno manjši kot pri medu. V validacijskem postopku smo preskusili različne vrste mleka, od surovega kravjega, ovčjega in kozjega do posnetega in steriliziranega trajnega mleka. Izbirali smo različno stare vzorce in na ta način preskusili vpliv shranjevanja na rezultate. Ugotovili smo, da je postopek čiščenja dovolj učinkovit, da lahko za vrednotenje uporabljamo umeritveno krivuljo pripravljeno s katero koli vrsto mleka, razen ovčjega. Slednje je izjema, pri kateri je vpliv matriksa na določitev vsebnosti oksitetraciklina znaten, zato je potrebno te vzorce vedno vrednotiti z metodo standardnega dodatka. Iz validacijskega poročila je razvidno, da je razvita metoda primerna za potrjevanje in kvantitativno vrednotenje prisotnih tetraciklinov v različnih vrstah mleka. Metoda je trenutno v postopku akreditacije (bila je že presojana).

Istočasno smo vpeljali encimatsko presejalno metodo določanja tetraciklinov in beta-laktamov v mleku s komercialnim testom TWINSENSOR, proizvajalca Unisensor iz Belgije. Pripravili smo standardni operativni postopek (SOP 391) in metodo validirali za obe skupini substanc in sicer za tetracikline (tetraciklin, klortetraciklin, doksiciklin in oksitetraciklin) ter za beta-laktame (penicilin G, ampicilin, amoksicilin, kloksacilin, nafcilin, cefapirin, cefalonium, cefazolin, cefoperaton, ceftiofur). Primernost metode, ki smo jo vpeljali potrjuje primerjava postavljenih mejnih vrednosti tetraciklinov in beta-laktamov v mleku z vrednostmi, ki jih dosega naša presejalna metoda.

Ob iskanju najustreznejše potrditvene metode za beta-laktame v mleku smo proučili starejše kromatografske metode z uporabo HPLC v kombinaciji z UV-detektorjem in novejše LC-MS/MS metode. Starejše metode so zahtevnejše in zamudnejše glede priprave vzorcev (ekstrakcija, čiščenje ekstraktov, koncentriranje), poleg tega zahtevajo predkolonsko derivatizacijo. Slednja je izredno zahtevna in dolgotrajna, poleg tega je potrebna uporaba toksičnega živosrebrovega klorida. Kljub nekaterim pomanjklivostim novejšega LC-MS/MS postopka smo se zaradi prednosti (predvsem enostavna ekstrakcija in čiščenje) odločili za uvedbo potrditvene metode z uporabo masnega detektorja.

Iz obsežne skupine beta-laktamov smo izbrali tiste, ki so registrirani za uporabo v veterinarski medicini. Najprimernejše topilo za pripravo večine standardnih raztopin je voda, kljub kratkotrajni stabilnosti takih raztopin. Optimirali smo kromatografski postopek ločbe in poiskali značilne ione, ki nam omogočajo kvantitativno določanje. Za detekcijo smo uporabili masni spektrometer Micromass Quattro Micro. Za ionizacijo smo uporabili pozitivni elektrosprej pri napetosti na kapilari 4,0 kV. S tuning-om smo poiskali najprimernejše ione za detekcijo vsakega od izbranih beta-laktamov na našem masnem detektorju. Za ampicilin sta značilna prehoda med masama 350,1 – 105,8 in 350,1 – 192,0, za cefalexin 348,1 – 157,9 in 348,1 – 174,1, za cefapirin 424 – 291 in 424 – 151,9, za cefquinome 529 – 133,9 in 529 – 324,1, za ceftiofur 523,9 – 242,7 in 523,9 – 210,1 ter za cephalonium 459,0 – 337,1 in 459,0 – 151,9. Kot problematični so se pokazali sledeči penicilini: amoksicilin, penicilin G in kloksacilin, pri katerih še nismo našli ustreznih pogojev za masno detekcijo.

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, gradbeništvo, 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?

Za potrebe monitoringa nad ostanki veterinarsko-medicinskih učinkovin v živilih živalskega izvora uporabljamo dve novi presejalni metodi, ki omogočata obdelavo večjega števila vzorcev istočasno in s tem lahko hitreje opravljamo preiskave za potrebe nadzora. ELISA presejalno metodo uporabljamo za določanje tetraciklinov v medu. Metoda je bila validirana skladno z Odločbo komisije 2002/657/EC in akreditirana v letu 2009 pri Slovenski akreditacijski hiši (SA).

TWINSSENSOR metodo uporabljamo predvsem v primerih, ko z Delvo testom dobimo pozitivne vzorce mleka. Nova metoda nam omogoča, da lahko določimo skupino prisotnih antibiotikov (beta laktami ali teraciklini).

Vpeljana je bila metoda za kvalitativno in kvantitativno določanje štirih tetraciklinov (tetraciklin, klortetraciklin, oksitetraciklin in doksiciklin) v živilih živalskega izvora z LC-MS/MS tehniko. Za mleko je bila metoda tudi v celoti validirana skladno z Odločbo komisije 2002/657/EC. SA je prvega in drugega junija 2010 že opravila akreditacijski pregled, tako da sedaj čakamo na izstavitev akreditacijske listine. Metodo smo akreditirali kot fleksibilno, z možnostjo dopolnjevanja analitov in matriksov. Omenjeno metodo že uporabljamo za potrditev in kvantitativno določitev tetraciklinov v vzorcih, ki smo jih s presejalnimi metodami označili za sumljive.

Z vpeljanimi metodami je izboljššan nadzor nad ostanki zadevnih substanc v živilih in s tem neoporečnosti živil živalskega izvora.

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

Rezultati raziskave omogočajo mednarodno primerljivo izvajanje kontrole vsebnosti tetraciklinov in beta laktamov v živilih živalskega izvora in predstavljajo pomembno osnovo za obvladovanje prisotnosti teh substanc v prihodnosti.

Z omenjenimi postopki bomo lažje izpolnjevali zahteve za potrebe monitoringa nad veterinarsko-medicinskimi pripravki v živilih živalskega izvora.

Postopki so tudi uporabni pri študijah kopičenja in izločanja zadevnih učinkovin v različnih tkivih pri živalih, katerim smo učinkovino aplicirali.

Metode lahko tudi uporabljamo za študije obstojnosti ostankov v tkivih teh živali.

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?

Institute for Reference Materials and Measurements, European Commission Joint Research Centre, Geel, Belgija.

3.7. Število diplomantov, magistrrov 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.

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

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

Z Institute for Reference Materials and Measurements, European Commission Joint Research Centre, Geel, Belgija, smo sodelovali pri pripravi certificiranega referenčnega materiala oksitettraciklina v mleku ERM-BB492.

SOP 298 (Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani, Gerbičeva 60, 1115 Ljubljana): Ugotavljanje in potrditev ostankov tetraciklinov (TC, OTC, CTC, DC) z LC-MS/MS. Odobren 19. 3. 2010, 18 strani.

Validation Report for the Procedure "Identification and Confirmation of Tetracyclines Residues" with LC-MS/MS - milk. Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Gerbičeva 60, 1115 Ljubljana, odobreno 22. 3. 2010, 16 strani.

SOP 375 (Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani, Gerbičeva 60, 1115 Ljubljana): Preiskava na tetraciklinske antibiotike z ELISA RIDASCREEN® testom. Odobren 29. 5. 2009, 8 strani.

Validation Report for the Procedure "Detection of the Presence of Tetracycline Antibiotics with ELISA RIDASCREEN® Test". Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Gerbičeva 60, 1115 Ljubljana, odobreno 28. 5. 2009, 5 strani.

SOP 391 (Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani, Gerbičeva 60, 1115 Ljubljana): Preiskava na tetraciklinske in beta-laktamske antibiotike v mleku s testom TWINSENSOR. Odobren 28. 9. 2009, 7 strani.

Validation Report for the Procedure "Detection of the Presence of some β -lactam and Tetracycline Antibiotics with TWINSENSOR Test". Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Gerbičeva 60, 1115 Ljubljana, odobreno 5. 6. 2009, 7 strani.

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.