

Prítomnosť deoxynivalenolu v krmivách pre monogastrické zvieratá

Michaela Harčárová¹

Pavel Nad²

Alena Hreško Šamudovská³

¹ Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; michaela.harcarova@uvlf.sk

² Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; pavel.nad@uvlf.sk

³ Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; alena.hreskosamudovska@uvlf.sk

Grant: VEGA č. 1/0402/20

Název grantu: Vplyv aditív vo výžive monogastrických zvierat na produkčné zdravie, produkciu, kvalitu produktov a životné prostredie.

Oborové zaměření: GH - Výživa hospodárskych zvierat

© GRANT Journal, MAGNANIMITAS Assn.

Abstrakt Základný prvok v prevencii vzniku alimentárnych intoxikácií ľudí a zvierat predstavuje pravidelný monitoring koncentrácií mykotoxínov v krmivách a potravinách. Táto práca bola zameraná na kvantitatívne stanovenie deoxynivalenolu v kompletných krmivách pre monogastrické zvieratá (brojlery a morky). Vo všetkých vyšetrených vzorkách krmných zmesí sa výskyt deoxynivalenolu potvrdil. Priemerná koncentrácia deoxynivalenolu v krmive pre brojlery bola 1,776 mg.kg⁻¹ a v krmive pre morky dosahovala hodnotu 0,675 mg.kg⁻¹. Stanovené koncentrácie deoxynivalenolu (mg.kg⁻¹) spĺňajú požiadavky na mykotoxickú bezpečnosť krmív podľa Odporúčania ES 2006/576/ES.

Kľúčová slova mykotoxíny, krmne zmesi, monogastrické zvieratá

1. ÚVOD

Obilniny ako dominantné plodiny pestované na ornej pôde majú dôležitý význam vo výžive ľudí, slúžia na krmne účely alebo priemyselne spracovanie, najmä kvôli ekonomickej výhodnosti ich pestovania a stabilite dosahovaných úrod. Sú hlavnými komponentmi krmných zmesí pre zvieratá. Významnou mierou sa podieľajú na zabezpečení prísunu energie a dusíka. Okrem samotnej prítomnosti obilnín v kompletnej krmnej zmesi je dôležité aj ich druhové zastúpenie. Významné druhy v rámci obilnín predstavujú pšenica, jačmeň, raž, ovos a kukurica. Prítomnosť týchto druhov obilnín v krmných zmesiach pre monogastrické zvieratá predstavuje pre zvieratá určité zdravotné riziká v podobe výskytu mikroskopických vláknitých húb a ich sekundárnych metabolitov mykotoxínov. Obilniny predstavujú vhodný substrát pre rozmnožovanie a rast mikroskopických húb už počas vegetácie, ale aj v období ich skladovania.

Medzi poľnohospodársky najvýznamnejšie rody mikromycét patrí celosvetovo sa vyskytujúci rod *Fusarium* spp. (Gab-Allah a kol., 2023). Rod *Fusarium* patrí medzi tzv. potenciálne toxínogénne druhy húb, ktoré sú za vhodných environmentálnych podmienok schopné syntézy sekundárnych metabolitov. Optimálne podmienky

pre tvorbu fuzáriotoxínov predstavujú teplotu od 15 do 25 °C, relatívnu vlhkosť zrna od 20 do 25 % a slabo kyslé pH prostredia. Najrozšírenejšiu skupinu fuzáriotoxínov tvoria trichotecény, ktoré sa podľa funkčnej chemickej skupiny rozdeľujú do štyroch základných skupín (A, B, C a D) (McCormick a kol., 2011). V obilninách sú dominantnými trichotecény typu A a B. Za celosvetovo najbežnejší trichotecén sa považuje deoxynivalenol, ktorý môže byť produkovaný najmä druhmi *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae* a *F. acuminatum* (Pinto a kol., 2022).

Deoxynivalenol pôsobí predovšetkým cytotoxicky, imunotoxicky a neurotoxicky (Wan a kol., 2022), inhibuje syntézu DNA a RNA na ribozomálnej úrovni a poškodzuje expresiu cytokínov, zvyšuje množstvo intracelulárneho vápnika s následnou aktiváciou kapsázy, čo vedie k zlomu DNA a bielkovín a k apoptóze buniek (Este a kol., 2022).

Klinické príznaky po perorálnom prijatí deoxynivalenolu sa prejavujú najmä gastrointestinálnymi poruchami, pretože jeho vplyvom dochádza k zníženiu produkcie hlienu prostredníctvom pohárikových buniek, k poškodeniu črevných klkov a tým k narušeniu integrity črevnej bariéry s následnými poruchami vstrebávania živín (Pinto a kol., 2022; Wan a kol., 2022). Na účinky deoxynivalenolu sú najcitlivejšie ošípané, nasleduje hydina a najmenej citlivý je hovädzí dobytok. Pri hydine bolo pozorované okrem zhoršenia produkčného zdravia postihnutých jedincov aj zníženie kvality vaječnej škrupiny, znížená hmotnosť vajca a vo vajciach boli potvrdené reziduá deoxynivalenolu. U brojlerov sa pozoroval vznik progresívnej rachitídy následkom podávania krmiva s obsahom deoxynivalenolu (Dänicke, 2002).

Cieľom tejto práce bolo stanoviť koncentrácie trichotecény deoxynivalenolu v krmných zmesiach pre brojlery a morky prostredníctvom ELISA imunoanalýzy a porovnať výsledné koncentrácie s aktuálne platnými smerodajnými hodnotami podľa odporúčania Európskej Únie (Odporúčanie ES 2006/576/ES).

2. MATERIÁL A METODIKA

2.1 Vzorky kŕmnych zmesí

Celkovo bolo vyšetrených 16 vzoriek kompletných kŕmnych zmesí pre brojlery a 4 vzorky boli kŕmne zmesi pre morky. Vzorky (n=20) boli určené pre rôzne štádia výkrmu hydiny. Kŕmne zmesi pre brojlerov a morky boli získané od komerčných výrobcov. Základnými zložkami kompletného krmiva pre brojlery boli okrem iných komponentov pšenica, kukurica a sójový šrot. Kŕmna zmes pre morky pozostávala predovšetkým z kukurice, pšenice, sójového šrotu, pšeničných otrúb a ostatných zložiek. Kŕmne zmesi pre hydinu boli vo forme peliet.

2.2 ELISA analýza kŕmnych zmesí

Na stanovenie koncentrácií deoxynivalenolu vo vzorkách kŕmnych zmesí bola použitá imunoanalýza ELISA. Analýzy boli vykonané pomocou kitu Veratox – Veratox for deoxynivalenol (Neogen Corporation, Lansing, USA).

Vzorky na stanovenie koncentrácií deoxynivalenolu boli spracované nasledovným spôsobom: 10 g z každej kŕmnej zmesi bolo pomletých a zmiešaných so 100 ml destilovanej vody. Vzorky boli 3 minúty miešané na trepačke (Orbital Shaker – Biosan) a následne prefiltrované cez filtračný papier Whatman 1. Filtráty (s minimálnym objemom 5 ml) boli po riedení s destilovanou vodou v pomere 1:2 použité na kvantitatívne stanovenie deoxynivalenolu pomocou ELISA kitu.

Princípom stanovenia koncentrácií deoxynivalenolu pomocou kompetitívnej enzýmovej imunisorbentnej analýzy je, že voľný mykotoxín vo vzorkách a štandardoch súťaží s enzýmom značeným konjugátom o väzbové miesta protilátok. Substrát, ktorý sa pridáva po premytí vzoriek, reaguje s naviazaným konjugátom za vzniku modrej farby. Menej intenzívne zafarbenie vzoriek predstavuje vyššie koncentrácie mykotoxínu.

Test sa vykonáva v mikrotitračnej platničke a pomocou platničkového ELISA readeru (Dynex Technologies, Inc., Chantilly, USA) pri vlnovej dĺžke 650 nm sa spektrofotometricky odčítajú absorbcie jednotlivých vzoriek. Absorbancie štandardov tvoria štandardnú krivku, pomocou ktorej sa vypočíta presná koncentrácia deoxynivalenolu v mg.kg⁻¹ (ppm).

2.3 Štatistická analýza

Na vyhodnotenie priemernej hodnoty koncentrácií a mediánu boli použité štatistické funkcie programu MS Excel.

3. VÝSLEDKY

V tabuľka č. 1 sú uvedené koncentrácie deoxynivalenolu kvantitatívne stanovené pomocou ELISA metódy v kompletných krmivách pre brojlery a morky. Vo všetkých vzorkách krmiva pre brojlerov sa potvrdil výskyt deoxynivalenolu v rozmedzí koncentrácií od 0,435 do 1,829 mg.kg⁻¹ s priemernou hodnotou 1,776 mg.kg⁻¹. Rovnako bol deoxynivalenol prítomný aj vo všetkých vzorkách krmiva pre morky s koncentraciami 0,283 mg.kg⁻¹ – 1,067 mg.kg⁻¹ a priemernou koncentraciou 0,675 mg.kg⁻¹.

Tabuľka 1 Koncentrácie deoxynivalenolu (ppm; mg.kg⁻¹) vo vzorkách kŕmnych zmesí pre hydinu

Parametre	Krmivo pre brojlery	Krmivo pre morky
n	16	4
+n	16/16	4/4
Min.	0,435	0,283
Max.	1,829	1,067
x	1,776	0,675
Median	1,179	0,675

n – celkový počet vzoriek, +n – počet pozitívnych vzoriek z celkového počtu vzoriek, Min. – min. koncentrácia deoxynivalenolu, Max. – max. koncentrácia deoxynivalenolu, x – priemerná hodnota koncentrácií deoxynivalenolu

4. DISKUSIA

Obilniny predstavujú základnú krmovinu na výrobu kompletných kŕmnych zmesí pre monogastrické zvieratá. Hlavnými zložkami krmív pre brojlery a morky sú okrem iných komponentov predovšetkým pšenica a kukurica, ktoré sú zdrojom energie (Khalil a kol., 2021). Tieto obilniny sú vhodnými substrátmi pre rast mikroskopických vláknitých húb, ktoré môžu byť pôvodcami toxických látok – mykotoxínov. Mykotoxíny môžu kontaminovať nielen krmivá, ale aj potraviny a môžu spôsobiť akútnu, subakútnu a chronickú intoxikáciu až smrť zvierat a ľudí (Oğuz a kol., 2022).

V súčasnej dobe je známych viac ako 500 mykotoxínov a medzi celosvetovo najčastejšie sa vyskytujúce mykotoxíny patrí deoxynivalenol (Stein a Bulboacă, 2017). Popisuje sa, že brojlery, ktoré konzumujú krmivo s obsahom deoxynivalenolu, nedosahujú požadované prírastky na hmotnosti a krmivo s obsahom deoxynivalenolu v koncentrácii 10 mg.kg⁻¹ spôsobuje zníženú konverziu krmiva (Ghareeb a kol., 2013). Kurčatá a nosnice reagujú na zvyšujúce sa koncentrácie deoxynivalenolu v potrave znížením produktivity iba pri vysokých hladinách nad 5 mg.kg⁻¹, ale neexistuje jasný dôkaz o vzťahu medzi dávkou a odozvou organizmu (Awad a kol., 2008). Deoxynivalenol tiež zasahuje do biochemických indikátorov, čoho dôsledkom býva zhoršený metabolizmus proteínov a lipidov hydiny spolu so zmenenými imunitnými parametrami (Yang a kol., 2020). Zmeny v hematologických alebo imunologických parametroch môžu negatívne ovplyvňovať produktivitu a senzitivitu zvierat k chorobám, čo sa prejavuje najmä u mladých jedincov (Awad a kol., 2008).

Vo všetkých nami vyšetrených vzorkách kŕmnych zmesí pre hydinu bol zaznamenaný výskyt deoxynivalenolu v rozmedzí od 0,435 mg.kg⁻¹ do 1,829 mg.kg⁻¹. Rovnako sa deoxynivalenol vyskytoval vo všetkých vzorkách krmiva pre hydinu vyšetrených v Poľsku, ale v rozmedzí nižších koncentrácií 0,003–0,099 mg.kg⁻¹ (Cegielska-Radziejewska a kol., 2013). Podobné výsledky zaznamenali Greco a kol. (2014), ktorí uviedli, že deoxynivalenol bol nájdený v 90 % analyzovaných vzoriek. Priemerná koncentrácia deoxynivalenolu v pozitívnych vzorkách (56 %) kŕmnych zmesí pre hydinu zo Slovenska v roku 2005 bola 0,303 mg.kg⁻¹ (Labuda a kol., 2005). Naproti tomu Magnoli a kol. (2002) pozorovali iba 6 % kontamináciu krmív pre hydinu deoxynivalenolom v Argentíne.

V rámci Európskej Únie sú stanovené najvyššie prípustné hodnoty nežiadúcich látok vrátane mykotoxínov v krmivách pre zvieratá (Smernica ES 2002/32/ES). Smerodajná hodnota koncentrácií deoxynivalenolu v kompletnom krmive pre hydinu predstavuje 5 mg.kg⁻¹ (Odporúčanie ES 2006/576/ES). Preto môžeme skonštatovať, že výsledné koncentrácie deoxynivalenolu, ktoré sme

stanovili vo vyšetrených vzorkách krmív pre hydinu spĺňajú kritériá uvedené v Odporúčaní ES 2006/576/ES.

5. ZÁVER

Hoci deoxynivalenol patrí medzi najmenej toxické mykotoxíny, jeho pravidelný monitoring v krmivách a potravinách je dôležitý najmä z hľadiska potenciálnej kontaminácie obilnín. Hydina sa považuje za menej citlivú na toxické účinky deoxynivalenolu v porovnaní s inými druhmi zvierat. Avšak hrozba v podobe mykotoxikóz, môže byť príčinou narušenia produkčného zdravia zvierat a ekonomických strát. Naše čiastkové výsledky naznačujú, že výskyt deoxynivalenolu v kompletných krmných zmesiach pre hydinu je v súlade s právnymi normami, ale v systéme prevencie sú potrebné neustále kontroly prítomnosti deoxynivalenolu nielen v krmivách, ale aj v krmovinách a potravinách.

Zdroje

1. AWAD, W.A., GHAREEB, K., BOHM, J., RAZZAZI, E., HELLWEG, P., ZENTEK, J. The impact of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) on poultry. *International Journal of Poultry Science*. 2008, 7, 827-842. DOI: 10.3923/ijps.2008.827.842.
2. CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA, R., STUPER, K., SZABLEWSKI, T. Microflora and mycotoxin contamination in poultry feed mixtures from western Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2013, 20, 1, 30-35.
3. DĀNICKE, S. Prevention and control of mycotoxins in the poultry production chain: A European view. *World's Poultry Science Journal*. 2002, 58, 451-474. DOI: 10.1079/WPS20020033.
4. EC DIRECTIVES 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed.
5. EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission Recommendation 576/2006/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding.
6. FĀESTE, C.K., SOLHAUG, A., GABORIT, M., PIERRE, F., MASSOTTE, D. Neurotoxic Potential of Deoxynivalenol in Murine Brain Cell Lines and Primary Hippocampal Cultures. *Toxins (Basel)*. 2022, 10, 14, 48. DOI: 10.3390/toxins14010048.
7. GAB-ALLAH, M.A., CHOI, K., KIM, B. Type B Trichothecenes in Cereal Grains and Their Products: Recent Advances on Occurrence, Toxicology, Analysis and Post-Harvest Decontamination Strategies. *Toxins*. 2023, 15, 2, 85. DOI: 10.3390/toxins15020085.
8. GHAREEB, K., AWAD, W.A., SOODOI, C., SASGARY, S., STRASSER, A. Effects of feed contaminant deoxynivalenol on plasma cytokines and mRNA expression of immune genes in the intestine of broiler chickens. *PLoS ONE*. 2013, 9, e100051. DOI: 10.1371/journal.pone.0100051.
9. GRECO, M.V., FRANCHI, M.L., GOLBA, S.L.R., PARDO, A.G., POSE, G.N. 2014. Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Poultry Feed for Food-Producing Animals. *The Scientific World Journal*. 2014, 1-9. DOI: 10.1155/2014/968215.
10. KHALIL, M.M., ABDOLLAHI, M.R., ZAEFARIAN, F., CHRYSAL, P.V., RAVINDRAN, V. Apparent metabolizable energy of cereal grains for broiler chickens is influenced by age. *Poultry Science*. 2021, 100, 101288. DOI: 10.1016/j.psj.2021.101288.
11. LABUDA, R., PARICH, A., BERTHILLER, F., TANČINOVÁ, D. Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia. *International Journal of Food Microbiology*. 2005, 105, 1, 19-25. DOI: 10.1016/j.ijfoodmi.2005.06.005.
12. MAGNOLI, C.E., CHIACCHIERA, S.M., MIAZZO, R. 2002. The mycoflora and toxicity of feedstuffs from a production plant in Cordoba, Argentina. *Mycotoxin Research*. 2002, 18, 1, 7-22. DOI: 10.1007/BF02946135.
13. McCORMICK, S.P., STANLEY, A.M., STOVER, N.A., ALEXANDER N.J. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins*. 2011, 3, 7, 802-814. DOI: 10.3390/toxins3070802.
14. OGUZ, H., BAHÇIVAN, E., ERDOĞAN, T., YALCIN, N.F., OZDAS, A., ISIK, M. K., ALTUNBAS, O. In vitro mycotoxin binding capacities of clays, glucomannan and their combinations. *Toxicon*. 2022, 214, 93-103. DOI: 10.1016/j.toxic.2022.05.006.
15. PINTO, A.C.S.M., DE PIERRI, C.R., EVANGELISTA, A.G., GOMES, A.S.D.L.P.B., LUCIANO, F.B. Deoxynivalenol: Toxicology, Degradation by Bacteria, and Phylogenetic Analysis. *Toxins*. 2022, 14, 90. DOI: 10.3390/toxins14020090.
16. STEIN, R.A., BULBOAČ, A.E. Chapter 21 - Mycotoxins, Editor(s): Christine E.R. Dodd, Tim Aldsworth, Richard A. Stein, Dean O. Cliver, Hans P. Riemann, *Foodborne Diseases (Third Edition)*, Academic Press. 2017, pp. 407-446, ISBN 9780123850072. DOI: 10.1016/B978-0-12-385007-2.00021-8.
17. WAN, S., SUN, N., LI, H., KHAN, A., ZHENG, X., SUN, Y., FAN, R. Deoxynivalenol damages the intestinal barrier and biota of the broiler chickens. *BMC Veterinary Research*. 2022, 18, 1-10. DOI: 10.1186/s12917-022-03392-4.
18. YANG, X., LIANG, S., GUO, F., REN, Z., YANG, X., LONG, F. Gut microbiota mediates the protective role of *Lactobacillus plantarum* in ameliorating deoxynivalenol-induced apoptosis and intestinal inflammation of broiler chickens. *Poultry Science*. 2020, 99, 2395-2406. DOI: 10.1016/j.psj.2019.10.034.