

Prítomnosť zearalenónu a T-2 toxínu v krmivách pre ošípané

Michaela Harčárová¹
Pavel Nad²
Alena Hreško Šamudovská³
Andrej Marcin⁴

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

⁴ Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; andrej.marcin@uvlf.sk

Grant: VEGA č. 1/0402/20; KEGA č. 006UVLF-4/2022

Název grantu: VEGA č. 1/0402/20 Vplyv aditív vo výžive monogastričných zvierat na produkčné zdravie, produkciu, kvalitu produktov a životné prostredie; KEGA č. 006UVLF-4/2022 Študijné texty a virtuálne laboratórium pre e-vzdelávanie v oblasti technológií a bezpečnostných systémov pri výrobe krmív

Oborové zamčrení: GH - Výživa hospodárskych zvierat

© GRANT Journal, MAGNANIMITAS Assn.

Abstrakt Fuzáriotoxíny patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce mykotoxíny v krmovinách a krmivách. Prítomnosť mykotoxínov v krmivách môže byť príčinou vzniku mykotoxikóz zvierat, ktoré majú negatívny dopad na ich zdravie a produkciu. Naša práca bola zameraná na stanovenie dvoch významných fuzáriotoxínov zearalenónu a T-2 toxínu pomocou ELISA analýzy a porovnanie ich koncentrácií vo vzorkách krmív pre ošípané. T-2 toxín sa vyskytoval vo všetkých nami vyšetrených vzorkách (100 %) v rozsahu koncentrácií 12,815 ppb – 57,308 ppb s priemernou hodnotou 35,288 ppb. Koncentrácie zearalenónu vo vzorkách krmív pre ošípané nedosiahli limit pre stanovenie 5 ppb, preto v krmivách neboli detegované. Výsledné koncentrácie oboch mykotoxínov boli v súlade s aktuálnou legislatívou.

Kľúčová slova Kontaminácia, mykotoxíny, ošípané, T-2 toxín, zearalenón

1. ÚVOD

Európska únia (EÚ) zaisťuje bezpečnosť krmív stanovením maximálnych hladín rôznych kontaminantov vrátane mykotoxínov (Tab 1). Mykotoxíny sú sekundárne metabolity produkované mikroskopickými vláknitými hubami rôznych rodov (napr. *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* a iné). Mykotoxíny ako cudzorodé látky môžu kontaminovať krmoviny (najmä obilniny) už počas rastu na poli, počas zberu, spracovania a skladovania (Arroyo-Manzanares a kol., 2019). Väčšina mykotoxínov je v prirodzených podmienkach extrémne stabilná a nemožno ich odbúrať jednoduchými fyzikálnymi postupmi. V súčasnosti je známych niekoľko stoviek mykotoxínov, ktoré vykazujú veľkú štruktúrnu diverzitu, čo prispieva k širokému spektru ich toxických interakcií. Aflatoxín B₁, ochratoxín A, deoxynivalenol, T-2 toxín, zearalenón (ZEA), fumonizín B₁ a patulín sú celosvetovo najdôležitejšie

mykotoxíny (Yu a Pedrosa, 2023). Na rozdiel od bakteriálnych toxínov alebo toxínov rias je akútna intoxikácia spôsobená mykotoxínmi vo vysoko industrializovaných krajinách sporadická. Ohrozenie však spočíva z chronického vystavenia karcinogénnym, mutagénnym a teratogénnym účinkom mykotoxínov. Preto by mali byť krmoviny a krmivá pravidelne monitorované z hľadiska bezpečnosti kŕmenia. Náhlý nárast veľkoplošného pestovania (najmä kukurice) prispieva k zvýšenej kontaminácii krmív mykotoxínmi. Vplyv fuzáriotoxínov na zvieratá sa líši a závisí od mnohých faktorov, ako je typ produkcie, plemeno a vek zvierat. Monogastričné druhy (napríklad ošípané) sú citlivejšie ako prežúvavce (Truszczyński a Pejsak, 2010).

Tabuľka č. 1 Smerodajné hodnoty mykotoxínov v krmovinách a krmivách podľa Odporúčania ES 2006/576/EC

Mykotoxín	Krmovina, krmivo	Smerodajná hodnota $\mu\text{g.kg}^{-1}$
Zearalenón	Kŕmne suroviny	-
	Obilniny a výrobky z obilnín s výnimkou vedľajších výrobkov z kukurice	2000
	Vedľajšie produkty z kukurice	3000
	Doplňkové a kompletne krmivá	-
	Doplňkové a kompletne krmivá pre prasničky	100
T-2 toxín	Doplňkové a kompletne krmivá pre prasnice a ošípané vo výkrme	250
	Obilniny na kŕmenie a kŕmne zmesi	-
	Produkty z mletia ovsu (plevy)	2000
	Ostatné výrobky z obilnín	500
	Kŕmne zmesi	250

Zearalenón produkujú huby rodu *Fusarium* spp., hlavne *F. graminearum* a *F. culmorum*, ďalej *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense*, *F. semitectum*, *F. verticillioides*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum* a *F. acuminatum* (Ropejko a Twaruzek, 2021). Jeho syntéza je zvýšená pri vysokej vlhkosti prostredia so striedaním nízkych (11–14°C) a vyšších (27°C) teplôt (Ogunade a kol., 2018). Zearalenón pôsobí negatívne na folikulogézu cicavcov od skorých až po konečné štádiá oogenézy. Podobne ako $\beta 7$ - estradiol, zearalenón inhibuje sekréciu steroidných hormónov, naruša estrogénové reakcie počas predovulačného štádia a potláča dozrievanie ovariálnych folikulov u cicavcov. Tieto javy môžu mať za následok predovšetkým reprodukčné poruchy u domácich zvierat (Zhang a kol., 2018). U ošípaných sa zearalenón biotransformáciou v pečeni mení na ešte toxickjší -zearalenol, ktorý má vyššiu schopnosť väzby na estrogénne receptory ako samotný zearalenón (Pack a kol., 2020). Klinicky sa u ošípaných intoxikácia zearalenómom prejavuje zmenami na pohlavnom aparáte a to vo forme edému a hyperémie vulvy, narušením reprodukčného cyklu a gravidity prasníc. U kancov môže dôjsť k feminizácii, atrofii semenníkov a k zníženiu libida (Awuchi a kol., 2021).

T-2 toxín je produkovaný rôznymi druhmi rodu *Fusarium*, najmä *F. sporotrichioides*, *F. poae* a *F. acuminatum*. Optimálna teplota pre syntézu T-2 toxínu je 20–30°C (Janik a kol., 2021).

T-2 toxín predstavuje potenciálnu hrozbu pre zvieratá ako prírodný kontaminant obilnín a môže vyvolať širokú škálu negatívnych účinkov kvôli svojej silnej toxicite v závislosti od dávky, veku a spôsobov expozície (orálna, dermálna a aerosólová). Vo všeobecnosti pozorované príznaky akútnej mykotoxikózy sú odmietanie krmiva, vomitus, nekróza žalúdka a dermatitída (Garai a kol., 2020). U prasníc sa ukázalo, že toxín T-2 toxín môže byť príčinou neplodnosti a abortov, čo súvisí s jeho schopnosťou narušiť endokrinný systém (Meneely a kol., 2023).

Prítomnosť mykotoxínov v potrave nesúvisí len so zdravím zvierat, ale je aj problémom ľudského zdravia. Mykotoxíny môžu byť prítomné v produktoch živočíšneho pôvodu, ako je mlieko, mäso a vajcia. Z dôvodu možného prenosu týchto toxických zlúčenín do živočíšnych produktov je potrebný neustály monitoring mykotoxínov (Muñoz-Solano a González-Peñas, 2023). Táto práca bola zameraná na stanovenie a porovnanie výskytu zearalenónu a T-2 toxínu vo vzorkách krmív pre ošípané prostredníctvom imunoenzymatickej ELISA analýzy.

2. MATERIÁL A METODIKA

Prítomnosť fuzáriotoxínov (zearalenón a T-2 toxín) bola vyšetrená v 6 kompletných krmivách pre ošípané. Majoritou zložkou týchto vzoriek krmných zmesí boli obilniny, kukurica a pšenica. Vzorky boli na kvantitatívne stanovenie mykotoxínov pripravené podľa protokolov Veratox for zearalenone a Veratox for T-2/HT-2 toxin (Neogen Corporation, Lansing, USA). ELISA analýza bola vykonaná v 96-jamkových mikrotitračných platničkách. Princípom ELISA analýzy je, že dochádza ku konkurencii medzi neznáčeným a značeným antigénom (zearalenón; T2/HT2) o väzbové miesta protilátky. Mikrotitračná platnička bola premytá, aby sa odstránil nenaviazaný materiál a po pridaní enzýmového substrátu, ktorý reaguje za vzniku zmeny farby bol odmeraný naviazaný enzýmom značený antigén. Absorbancia bola stanovená pri špecifickej vlnovej dĺžke 650 nm pomocou ELISA readera (DYNEX Technologies, Inc., Chantilly, USA) pričom absorbancia je nepriamo úmerná množstvu prítomného toxínu (ppb).

3. VÝSLEDKY

Výsledky stanovenia koncentrácií zearalenónu a T-2 toxínu vo vzorkách krmív pre ošípané sú znázornené v tabuľke č. 2. Zearalenón v nami vyšetrených vzorkách krmív pre ošípané nebol detegovaný. Avšak T-2 toxín bol prítomný vo všetkých vzorkách (100 %) s priemernou hodnotou koncentrácií 35,288 ppb ($\mu\text{g.kg}^{-1}$).

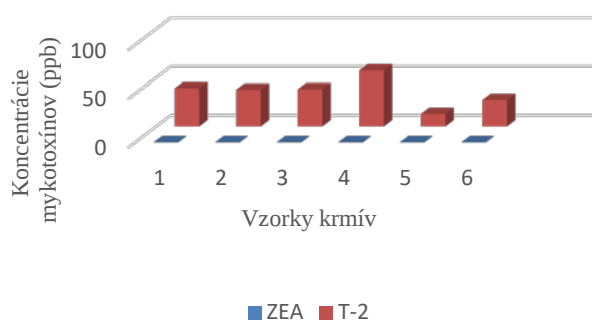
Tabuľka č. 2 Výskyt zearalenónu a T-2 toxínu vo vzorkách krmív pre ošípané

Parametre	Mykotoxíny	
	Zearalenón	T-2 toxín
n/%	0/0	6/100
Min.	nd	12,815
Max.	nd	57,308
x	-	35,288

N – celkový počet vzoriek, % - percento vzoriek s výskytom zearalenónu a T-2 toxínu, Min. – minimálna koncentrácia (ppb) zearalenónu a T-2 toxínu vo vzorkách, Max. – maximálna koncentrácia (ppb) zearalenónu a T-2 toxínu vo vzorkách, x – priemerná koncentrácia (ppb) zearalenónu a T-2 toxínu vo vzorkách, nd – nebol detegovaný (limit <5 ppb).

Porovnanie výsledných koncentrácií (ppb) zearalenónu a T-2 toxínu je uvedené v grafe č. 1, T-2 toxín sa vyskytoval v najvyššej koncentracii 57,308 ppb a jeho najnižšia koncentrácia predstavovala hodnotu 12,815 ppb. Koncentrácie zearalenónu (ppb) neboli v nami vyšetrených vzorkách stanovené, avšak koncentrácie zearalenónu sa mohli pohybovať pod limitom použitého kitu 5 ppb. V žiadnej nami vyšetrenej vzorke krmiva pre ošípané neboli prekročené odporúčané hodnoty zearalenónu a T-2 toxínu uvedené v Odporúčaní ES 2006/576/EC.

Graf č. 1 Porovnanie výskytu zearalenónu a T-2 toxínu vo vzorkách krmív pre ošípané



4. DISKUSIA

Ošípané sú druhom zvierat, ktoré veľmi senzitivne reagujú na toxické účinky mykotoxínov. Intoxikácie mykotoxínmi sa môžu u prasiat vyskytovať v sporadickej akútnej forme alebo v chronickej forme. Mykotoxíny celkovo narušajú zdravotný stav zvierat a spôsobujú poruchy imunitného systému, následkom čoho sú postihnuté jedince náchylné na sekundárne infekcie vírusového, bakteriálneho alebo hubového pôvodu. Navyše zearalenón pôsobí ako významný mykoestrogén, naruša hormonálny systém reprodukčného aparátu a tým spôsobuje ekonomické straty (Han a kol., 2022). T-2 toxín sa podieľa na poruchách gastrointestinálneho aparátu a môže pôsobiť aj dermatotoxicky (Quiroga a kol., 2009). Práve kvôli skrytej hrozbe, ktorú mykotoxíny predstavujú, je veľmi

dôležitý ich pravidelný monitoring v krmivách pre zvieratá a dodržiavanie odporúčaných koncentrácií v rámci legislatívy.

V nami vyšetrených vzorkách krmív pre ošípané neboli detegované hodnoty zearalenónu, resp. koncentrácie sa mohli pohybovať pod limitom použitého kitu na kvantitatívne stanovenie zearalenónu (<5 ppb). Naproti tomu, vo vzorkách krmív pre ošípané, ktoré boli vyšetrené v Chorvátsku sa zearalenón vyskytoval v 28 vzorkách z celkového počtu 30 vzoriek (93,3 %) v rozsahu koncentrácií od 8,93 do 866 ppb, pričom v 5 vzorkách (17 %) boli zistené koncentrácie, ktoré presahovali odporúčené hodnoty podľa EÚ (Pleadin a kol., 2012). Podobne, vo vzorkách zo Španielska, bola stanovená maximálna koncentrácia 816,0 ppb vo vzorkách krmív pre ošípané, ktorá presahovala odporúčaný limit podľa EÚ (Muñoz-Solano a González-Peñas, 2023). Prítomnosť T-2 toxínu sa v potvrdila vo všetkých nami vyšetrených vzorkách krmív pre prasatá a hodnoty koncentrácií sa pohybovali v rozsahu od 12,815 do 57,308 ppb. Pleadin a kol., (2012) potvrdili výskyt T-2 toxínu v 14 vzorkách z celkového počtu 30 (46,7 %) s minimálnou koncentráciou 21,0 ppb a maximálnou koncentráciou 78,8 ppb. Naproti našim výsledkom, vo vzorkách vyšetrených v Srbsku bol T-2 toxín nájdený v nižšom počte vzoriek 5,4 % (Jakić-Dimić a kol., 2009). Vzhľadom na výsledky našej čiastkovej práce, je potrebné uviesť, že všetky nami vyšetrené vzorky krmív pre ošípané spĺňali limity podľa odporúčania EÚ.

5. ZÁVER

Bezpečnosť a hygiena potravín a krmív sú významným problémom a veľká pozornosť sa venuje alimentárnym ochoreniam, s ktorými úzko súvisia intoxikácie mykotoxínmi tzv. mykotoxikózy. Správna poľnohospodárska prax a kontrola vo fáze pred zberom, počas zberu a po ňom, môžu výrazne znížiť mykotoxickú kontamináciu poľnohospodárskych komodít a produktov na báze obilnín. Dôležité je aj zabezpečenie vhodných podmienok skladovania (optimálna vlhkosť, pravidelné vetranie, opatrenia proti škodcom a pod.). Nezanedbateľným prvkom manažmentu mykotoxínov je sledovanie a dodržiavanie aktuálne platných nariadení o odporúčaných koncentráciách mykotoxínov v krmovinách a krmivách.

Zdroje

1. ARROYO-MANZANARES, N., RODRÍGUEZ-ESTÉVEZ, V., ARENAS-FERNÁNDEZ, P., GARCÍA-CAMPAÑA, A. M., GÁMIZ-GRACIA, L. Occurrence of mycotoxins in swine feeding from Spain. *Toxins*, 2019, 11, 342.
2. AWUCHI, C.G., ONDARI, E.N., OGBONNA, C.U., UPADHYAY, A.K., BARAN, K., OKPALA, C.O.R., KORZENIOWSKA, M., GUINÉ, R.P.F. Mycotoxins Affecting Animals, Foods, Humans, and Plants: Types, Occurrence, Toxicities, Action Mechanisms, Prevention, and Detoxification Strategies. A Revisit. *Foods*. 2021, 3, 10, 1279.
3. GARAI, E., RISA, A., VARGA, E., CSERHÁTI, M., KRISZT, B., URBÁNYI, B., CSENKI, Z. Qualifying the T-2 Toxin-Degrading Properties of Seven Microbes with Zebrafish Embryo Microinjection Method. *Toxins*. 2020, 12, 460.
4. HAN, X., HUANGFU, B., XU, T., XU, W., ASAKIYA, C., HUANG, K., HE, X. Research Progress of Safety of Zearalenone: A Review. *Toxins (Basel)*. 2022, 14, 386.
5. JAKIĆ-DIMIĆ, D., NEŠIĆ, K., PETROVIĆ, M. Mycotoxins in feed for pigs and poultry. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 2009, 6, 2, 1149-1154.
6. MENEELY, J., GREER, B., KOLAWOLE, O., ELLIOTT, C. T-2 and HT-2 Toxins: Toxicity, Occurrence and Analysis: A Review. *Toxins*. 2023, 15, 481.
7. MUÑOZ-SOLANO, B., GONZÁLEZ-PEÑAS, E. Co-Occurrence of Mycotoxins in Feed for Cattle, Pigs, Poultry, and Sheep in Navarra, a Region of Northern Spain. *Toxins*. 2023, 15, 172.
8. OGUNADE, I.M., MARTINEZ-TUPPIA, C., QUEIROZ, O.C.M., JIANG, Y., DROUIN, P., WU, F., ADESOGAN, A.T. Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *Journal of dairy science*. 2018, 101, 4034-4059.
9. ODPORÚČANIE KOMISIE 2006/576/ES o prítomnosti deoxynivalenolu, zearalenónu, ochratoxínu A, T-2 a HT-2 a fumonizínov vo výrobkoch určených na krmivo pre zvieratá. Dostupné on-line: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK/ALL/?uri=CELEX%3A32006H0576>.
10. PACK, E., STEWART, J., RHOADS, M., KNIGHT, J., DE VITA, R., CLARK-DEENER, S., SCHMALE, D.G. Quantification of zearalenone and α -zearalenol in swine liver and reproductive tissues using GC-MS. *Toxicon X*. 2020, 8, 100058.
11. PLEADIN, J., ZADRAVEC, M., PERŠI, N., VULIĆ, A., JAKI, V., MITAK, M. Mould and mycotoxin contamination of pig feed in northwest Croatia. *Mycotoxin Research*. 2012, 28, 157-162.
12. QUIROGA, M.A., MIGUEL, A.R., CARLOS, J.P.T. T-2 mycotoxin intoxication in piglets: a systematic pathological approach and apoptotic immunohistochemical studies. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 2009, 2.1, 16-22.
13. ROPEJKO, K., TWARUZEK, M. Zearalenone and Its Metabolites—General Overview, Occurrence, and Toxicity. *Toxins*. 2021, 13, 35.
14. TRUSZCZYŃSKI, M., PEJSAK, Z., 2010: Mycotoxins as a cause of immunosuppression in swine. *Veterinarni Medicina*. 2010, 66, 435-438.
15. YU, J., PEDROSO, I.R. Mycotoxins in Cereal-Based Products and Their Impacts on the Health of Humans, Livestock Animals and Pets. *Toxins*. 2023, 15.
16. ZHANG, G.L., FENG, Y.L., SONG, J.L., ZHOU, X.S. Zearalenone: A Mycotoxin with Different Toxic Effect in Domestic and Laboratory Animals' Granulosa Cells. *Frontiers in Genetics*. 2018, 9, 667.