

KONTAMINACIJA STOČNE HRANE TRIHOTECENIMA

CONTAMINATION OF FEEDS WITH TRICHOTHECENE

J. Žust, A. Vengušt, Zvonka Kabaj-Tomšič, U. Pestevšek

Izvorni znanstveni rad
UDK 636/636.085.19
Primljeno: 6. 8. 1991.

SAŽETAK

Provedena su istraživanja o kontaminaciji stočne hrane mikotoksinima iz grupe trihotecena primjenom kožnog testa na kunićima i kemijskom metodom tankoslojne (TLC) i plinske (GLC) kromatografije. Najbolji rezultati polučeni su metodom GLC. Njome je veliki broj trihotecena grupe A i B, te njihovih metabolita alkalnom hidrolizom pretvoren u odgovarajuće alkohole: T-2 tetraol, scirpentriol i deoksinivalenol. Identifikacija toksina potvrđena je masenom spektroskopijom. Donja granica detekcije ovih toksina utvrđena za zdrav kukuruz je 10 µg/kg, a za pljesniv kukuruz 100 µg/kg. Ovom metodom pretraženo je 26 uzoraka više ili manje pljesnivog kukuruza. Među toksinima najčešće su bili DON i njegovi metaboliti – u 72% uzoraka u prosječnoj koncentraciji 9,49 mg/kg (0,08-160,00 mg/kg). DAS i njegovi metaboliti utvrđeni su u 40% slučajeva u prosječnoj koncentraciji 0,18 mg/kg (0,01-1,00 mg/kg), a toksin T-2 i metaboliti u 44% uzoraka u koncentraciji 0,36 mg/kg (0,02-4,30 mg/kg). Osim trihotecena pronađen je u 50% uzoraka toksin F-2 u koncentraciji od 0,50 do 12,10 mg/kg, u tri uzorka aflatoxin B₁ (0,004-0,030 mg/kg), a ohratoksina A u jednom uzorku (0,02 mg/kg). Zbog manje osjetljivosti TLC metode i dokazivanja samo pojedinih toksina (T-2, DAS i DON) ovom metodom, utvrđeni postoci kontaminacije stočne hrane trihotecenima razmjerno su niži. Komparacija jačine kožne reakcije kemijski utvrđenom koncentracijom ukupnih dermatoksičnih trihotecena pokazala je vrlo signifikantnu korelaciju ($r = 0,60$, $P < 0,05$). U niti jednom od uzoraka bez ili sa slabom kožnom reakcijom nisu utvrđene veće količine dermatoksičnih toksina.

U navedenom radu prikazat ćemo rezultate biološkog i kemijskog ispitivanja trihotecena u stočnoj hrani kod nas i istaći značenje pojedinih metoda u ocjeni valjanosti kontaminirane krme za hranidbu domaćih životinja.

LITERATURA

Trihotecene proizvode gljivice iz roda *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotris*, *Cephalosporium* i *Trichoderma*. Najvažniji proizvođači tih toksina su *Fusarium tricinctum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium poae* i *Stachybotris atra*. Vrsta i količina toksina ovisi o supstratu, temperaturi, vlazi i drugim faktorima. Među toksinima izoliranim iz prirodnih supstrata najvažniji su T-2 toksin, diacetoksiscirpenol (DAS), deoksinivalenol (DON) i nivalenol (NIV), koji mogu pojedinačno ili u kombinaciji s drugim toksinima prouzročiti

zdravstvene poremećaje kod ljudi i životinja (Bamburg i Strong, 1971.; Smith i Moss, 1985.; Shepherd i Gilbert, 1986.; Wyllie i Morehouse, 1977.).

Trihoteceni su sekviterpeni (15 C atoma), čija osnova je trihotecenska jezgra 12, 13-epoksitrihotec-9-en. Dijelimo ih na 4 veće grupe A, B, C i D. Razlikuju se po supstituentima na C₃, C₄, C₇, C₈ i C₁₅. Grupe A, B i D obuhvaćaju jednostavne estere i alkohole trihotecena dok u grupu C ubrajamo makrociklične toksine. Najvažniji i najčešći su toksini iz grupe A (T-2 toksin, HT-2 toksin, T-2 teraol, neosolaniol, acetil T-2 toksin, diacetoksiscirpenol, 15-monoacetoksiscirpenol, scirpentriol) i grupe B (deoksinivalenol, diacetilniva-

Prof. dr. Janko Žust, dr. Anton Vengušt, mr. Zvonka Kabaj-Tomšič i doc. dr. Uroš Pestevšek – Univerza v Ljubljani, Veterinarski fakultet, Inštitut za higijeno in patologijo prehrane živali, Ljubljana.

lenol, fusarenon X, nivalenol, diacetildeksinivalenol) (Mirocha i Pathre, 1973.; Lacey, 1985.; Vidal, 1990.).

Toksičnost trihotecena dosta varira (Smalley, 1973.; Mirocha, 1979.; Lacey, 1985.). Ovisna je o više faktora prije svega o kemijskoj strukturi pojedinih toksina. Na toksin T-2 i DAS najosjetljivija je perad. Kod pilića veća koncentracija od 0,2 mg/kg toksina T-2 dovode do slabijeg prirasta. Kod nesilica 0,5 mg/kg toksina smanjuje konverziju krme a 1 mg/kg dovodi do smanjenja valivosti jaja. Najmanje toksične količine toksina T-2 kod svinja iznose 1,0 mg/kg, a za DAS 2,0 mg/kg krme. Približno jednake su toksične količine toksina T-2 i DAS za telad. Na otrovanje DON-om prouzrokuje povraćanje a 0,3 mg/kg smanjenu konzumaciju. Perad i odrasla goveda rezistentni su na DON, vjerojatno dolazi do razgradnje ovog toksina u probavnom traktu (Shepherd i Gilbert, 1986.).

Trihoteceni djeluju toksično na sluznicu probavnog trakta, kožu i druga tkiva. Klinički najčešće primjećujemo odbijanje hrane, povraćanje, proljev, edeme, nekroze i oštećenja limfatičnog tkiva. Osim toga trihoteceni djeluju citotoksično. Inhibiraju sintezu proteina u stanicama, naročito onima koje proizvode antitijela. Zbog toga dolazi do smanjenja otpornosti životinja prema infekcijama (Smith i Moss, 1985.; Vidal, 1990.). Trihoteceni su značajni i u etiologiji nekih poznatih mikotoksikoza koje su donedavna smatrali samostalnim bolestima. Utvrdili su da je alimentarna toksična aleukija koja je bila raširena kod ljudi i životinja na području Orenburga u SSSR-u od 1942. do 1947. etiološki vezana na trihotecene, na toksin T-2 (Mirocha i Pathre, 1973.). Slično je bilo nađeno i za stachyobotriotoksikozu kod konja. Eppley i Bailey (1973.) su u ekstraktu gljivica identificirali 5 toksičnih frakcija koje su bile kemijski slične trihotecenima. I sindrom povraćanja kod svinja pripisuju djelovanju trihotecena, naročito DON-a, koji draži sluznicu želuca i centar za povraćanje u mozgu (Vesonder i sur. 1973.).

MATERIJAL I METODE

Kožni test na kunićima obavili smo modificiranom metodom po Chungu (1974.). Ekstrahirali smo kloroformom 10 g kukuruza ili drugih krmiva, zatim smo kloroform isparili do suhoga i ostatak otopili u 0,1 ml etilacetata. Mikropipetom smo nanijeli 2 ul otopine (ekstrakt 0,2 g kukuruza) na kožu kunića. Osim ekstrakta krmiva na kožu smo uvijek aplicirali i 0,2 ul etilacetatnog ekstrakta toksina T-2 ili DAS. Time smo testirali individualnu osjetljivost kunića na dermatotoksičnost. Kožnu reakciju smo ocijenili vizualno poslije 24, 48 i 72 sata. U ocijeni reakcije upotrijebili smo slijedeće kriterije:

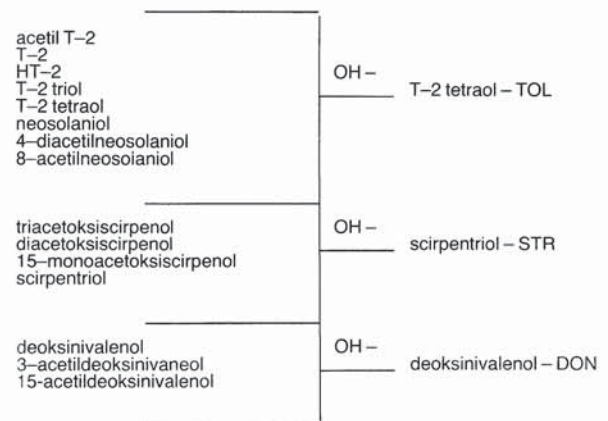
- | | |
|------|------------------------|
| 0 | – bez reakcije |
| – | – crvenilo kože |
| ++ | – jako crvenilo kože |
| +++ | – jako crvenilo i edem |
| ++++ | – edem i nekroza |

Na dermatotoksičnost pretražili smo ukupno 763 higijenski neispravna krmiva i krmnih smjesa za koje se sumnjalo da su prouzrokovale zdravstvene poremaćaje kod domaćih životinja. Za TLC određivanje trihotecena upotrijebili smo modificiranu metodu po Romeru (1986.).

Kromatograme trihotecena grupe A (toksin T-2 i DAS) na ploči tretirali smo koncentriranom sumpornom kiselinom a trihotecene grupe B (DON) s $AlCl_3$. Aktivacija kromatograma je uslijedila zagrijavanjem ploča u trajanju od 10 minuta na 130°C. Jakost fluorescencije pod UV svjetiljkom (356 nm) ocijenili smo vizualno. Metodom TLC analizirali smo 85 dermatotoksičnih uzoraka stočne hrane na toksin T-2, diacetokscirpenol te 90 uzoraka na deksinivalenol.

Za simultanu analizu trihotecena A i B grupe te njihovih metabolita upotrijebili smo metodu plinske kromatografije (Kabaj–Tomšič Zvonka, 1991.). Uzorke smo najprije ekstrahirali smjesom acetonitrila i vode (84 : 16), ekstrakt očistili na koloni aktivnog ugljena, neutralnog Al_2O_3 i aktivne zemlje (1 : 1 : 1) te na koloni Fluorisila. Zatim smo sve estere trihotecena (graf 1) alkalnom hidrolizom (0,15 M NaOH) pretvorili u njima srodne alkohole. Uvjeti hidrolize prilagođeni su tako, da su omogućili maksimalnu pretvorbu trihotecena grupa A u tetraol T-2 (TOL) i scirpentriol (STR) te minimalno utjecali na razgradnju DON. Za derivatizaciju trihotecena upotrijebili smo trifluorocetnu kiselinu čiji su derivati dali bolje rezultate na EC detektoru kao

GRAF 1: Hidroliza trihotecena



derivati heptafluorbutilimidazola. Analizu trihotecena, obavili smo na aparatu Hewlett Packard model 589 s detektorom ECD. Separacija toksina bila je obavljena na 30 m kapilarnoj koloni DB-5 (0,25 u). Kao nosivi plin upotrijebili smo dušik, temperatura injektora bila je 220 °C, detektora 250 °C, a kolone 180 °C. Kvalitativnu detekciju trihotecena potvrdili smo na GC s maseno selektivnim detektorom elektronskom i kemijskom ionizacijom. Za izradu kalibracijskih pravaca standarda upotrijebili smo metodu najmanjih kvadrata. Korelacijski koeficijenti i jednadžbe pravaca za TOL, STR i DON prikazani su na tablici 1.

Tablica 1: Korelacijski koeficijenti i jednadžbe pravaca za standarde trihotecena

Toksin	r	Jednadžba pravaca
TOL	0,9998	$y = 0,4351x + 0,0548$
STR	0,9959	$y = 0,3034x - 0,2166$
DON	0,9901	$y = 0,3271x + 0,5657$

Donja granica detekcije ovih toksina u zdravom kukuružu iznosila je 0,01 mg/kg, a u pljesnivom kukuružu 0,1 mg/kg.

GLC analizom na trihotecene i njihove metabolite pretražili smo 26 uzoraka kukuruža, koji su pokazali u kožnom testu na kuniću različiti stupanj kožne reakcije (od 0 do ++++).

Analizu uzoraka na toksin F-2, ohratoksin A i aflatoksine obavili smo simultanom metodom po Eppleyu (1968.).

REZULTATI I DISKUSIJA

Upotrebljivost kožnog testa za otkrivanje i kvantifikaciju dermatoksičnih trihotecena obavili smo na kunićima (tablica 2). Minimalnu kožnu reakciju (crvenilo kože) utvrdili smo

Tablica 2: Ocjena dermatoksičnosti toksina T-2 na koži kunića

Koncentracija toksina T-2 u ug/2 ul	Kožna reakcija nakon 72 sata
0,01	0 (bez reakcije)
0,05-0,10	+
0,15-0,20	++ (jako crvenilo kože)
0,20-0,40	+++ (izrazit edem kože)
> 0,60	++++ (nekroza)

kod aplikacije 0,05 ug a najjaču reakciju (izrazit edem s nekrozom kože) kod aplikacije više od 0,6 ug toksina. Ovom metodom, koju smo modificirali po Chungu (1974.), moguće je utvrditi u kukuružu više od 0,2 mg/kg ekvivalenta toksina T-2. U našim uvjetima rada bilo je, naime, moguće aplicirati na kožu ekstrakt iz najviše 0,2 g kukuruža otopljenog u 2 ul etilacetata. Kod rutinskog testa potrebno je osim ekstrakta kukuruža aplicirati i 0,2 ug standardne otopine toksina T-2 ili DAS. Time se utvrdi individualna osjetljivost testnih kunića na dermatoksične agense.

Na dermatoksičnost pretražili smo 763 različita krmiva i krmnih smjesa koje su bile higijenski neispravne zbog previsoke kontaminacije gljivicama ili su uzrokovale odnosno se sumnjalo da su uzrokovale zdravstvene ili proizvodne poremećaje kod domaćih životinja (tablica 3).

Tablica 3: Rezultati pretrage stočne hrane na dermatoksičnost

Godina	Broj uzoraka	Postotak pozitivnih	Postotak jako pozitivnih
1983.	81	35,0	13,6
1984.	53	33,9	16,9
1985.	119	34,5	12,6
1986.	82	42,7	7,3
1987.	91	27,5	3,3
1988.	163	14,1	6,1
1989.	78	39,7	10,2
1990.	96	28,1	5,2
Ukupno	763	29,9	8,8

Rezultati kožnog testa bili su pozitivni kod 228 (29,9%) uzoraka a od toga je 67 (8,8%) pokazalo vrlo jake reakcije (ocjena kožne reakcije 3 i 4).

Kemijski smo metodom tankoslojne kromatografije pretražili na prisutnost toksina T-2 i diacetoksiscirpenola 85 uzoraka kukuruža i krmnih smjesa koje su bile pozitivne u kožnom testu na kuniću. Toksin T-2 u koncentraciji od 1,0 do 3,5 mg/kg utvrdili smo u 9 uzoraka, a diacetoksiscirpenol u samo 2 uzorka u koncentraciji 1,0 i 2,0 mg/kg. Na deoksinivalenol (DON) pretražili smo 90 uzoraka različite krme. Pozitivno je bilo 26 (28,9%) uzoraka (tablica 4).

Tablica 4: Kontaminacija stočne hrane toksinom T-2, diacetoksiscirpenolom i deoksinivalenolom

Vrsta toksina	Broj uzoraka	Positivni u %	Koncentracija u mg/kg
T-2	85	10,6	1,0-3,5
DAS	85	2,4	1,0-2,0
DON	90	28,9	1,29 +- 0,78

S uspoređivanjem kožnog testa i rezultata kemijske analize na najvažnije dermatoksične trihotecene (toksin T-2 i DAS) može se utvrditi da je u dosta malenom postotku dermatoksičnih uzoraka pronađen toksin T-2 i DAS. Razlozi za to leže u niskoj osjetljivosti TLC metode, kojom se može dokazati samo veća koncentracija od 1,0 mg/kg navedenih toksina, a vjerojatno su osim toksina T-2 i DAS u krmivima prisutne i druge dermatoksične tvari, prije svega metaboliti tih toksina. To smo potvrdili pretragom 26 uzoraka higijenski neispravnih uzoraka kukuruža, koji su pokazivali različiti stupanj dermatoksičnosti (tablica 5), vrlo osjetljivom metodom plinske kromatografije i masene spektroskopije.

Tablica 5: Rezultati mikotoksikoloških pretraga 26 uzoraka kukuruza jako kontaminiranih gljivicama

Vrsta toksina	Prosječna koncentracija	Konzentracija		% pozit. uzoraka
		min.	max.	
STR mg/kg	0,18	0,01	1,00	40
TOL mg/kg	0,36	0,02	4,30	44
DON mg/kg	9,49	0,08	16,00	72
F-2 mg/kg	3,03	0,50	12,10	50

Toksin T-2 i metaboliti pronađeni su u 44% uzoraka u prosječnoj koncentraciji 0,36 (0,02 do 4,3) mg/kg. DAS i njegovi metaboliti utvrđeni su u 40% primjeraka u koncentraciji 0,18 (0,01 – 1,0) mg/kg. Najčešće su bili prisutni DON i njegovi metaboliti u 72% slučajeva u prosječnoj koncentraciji 9,49 (0,08 – 16,0) mg/kg. Osim trihotecena 50% uzoraka sadržavalo je i toksin F-2 u količini od 0,5 do 12,1 mg/kg, aflatoxin B¹ utvrdili smo 3 uzorka (0,004 – 0,030 mg/kg) a ohratoksin A u jednom uzorku (0,02 mg/kg).

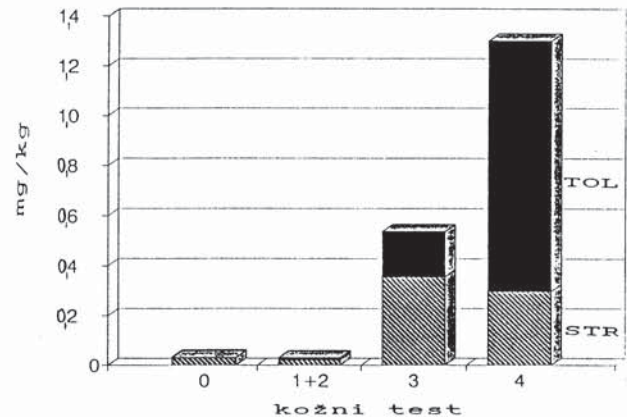
Komparacija jačine promjena na koži i kemijski utvrđene koncentracije dermatoksičnih trihotecena izraženih kao scirpentriol i tetraol T-2, pokazala je vrlo signifikantnu korelaciju ($r = 0,6$, $P < 0,05$) (Graf 2).

Uža međusobna korelacija nije postignuta zbog dva uzorka, koji su dali jaku kožnu reakciju a nisu sadržavali spomenute toksine. Vjerojatno su bili u njima prisutni i drugi dermatoksični agensi koje nismo obuhvatili ni ovom osjetljivom metodom prilagođenom za simultanu detekciju trihotecena grupe A i B. Na korisnost ove jednostavne metode upućuje činjenica, da ni u jednom od uzoraka bez ili sa slabom kožnom reakcijom nismo našli veće količine scirpentriola i tetraola T-2.

Literatura

- BAMBURG, J. R., F. M. STRONG (1971): Epoxy-trichothecenes V: Microbial toxins. Vol. 7. New York: Academic Press, 1971, 207-292.
- CHUNG, W. C., M. W. TRUCKNESS, A. L. GILES, L. FRIEDMAN (1974): Rabbit skin test for estimation of T-2 toxin and other skin-irritating toxins in contaminated corn. Assoc. Offic. Anal. Chem. 57, 5, 1121-1127.
- EPPLEY, R. M., W. J. BAILEY (1973): 12, 13-epoxy trichothecenes as the probable mycotoxins responsible for stahybotryotoxicosis. Science 181, 758-760.
- EPPLEY, R. M. (1968): Screening method for zearalenon, aflatoxin and ochratoxin. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 51, 1, 74-178.
- KABAJ-TOMAŠIČ, ZVONKA (1991): Analiza trihotecenov v kruzni. Magistrsko delo, Ljubljana.
- LACEY, J. (1985): Trichothecenes and other Mycotoxins. Chichester; New York; Brisbane; Toronto; Singapore: J. Wiley & Sons.
- MIROCHA, C. J., S. PATHRE (1973): Identification of the toxic principle in a sample of poaeufusarium. Appl. Microbiol. 266, 719-724.
- MIROCHA, C. J. (1979): Trichothecene toxins produced by Fusarium. Conference on mycotoxins in animal feeds and administration, Rockville, 288-373.
- MYCOTOXINS (1989): Economic and health risks. Task force report (Council for Agricultural Science and Technology) No. 116, Nov.
- ROMER, T. R. (1986): Use of small charcoal/alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxins in foods and feeds. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69, 4, 699-703.
- SHEPHERD, M. J., J. GILBERT (1986): Fusarium mycotoxins in cereals and other stored products. International Biodeterioration Supp., 22, 61-69.
- SMALLEY, E. B. (1973): T-2 toxin. J. Am. Vet. Med. Assoc., 163, 11, 1278-1281.
- SMITH, J. E., M. O. MOSS (1985): Mycotoxins. Formation, Analysis and Significance. Chichester; New York; Brisbane; Toronto; Singapore: J. Wiley & Sons.
- SNYDER, A. P. (1986): Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecene mycotoxins. J. Food Protection, 49, 544-569.
- VESONDER, R. F., A. CIEGLER, A. H. JENSEN (1973): Isolation of the emetic principle from Fusarium-infected corn. Appl. Microbiol., 26, 6, 1008-1010.
- VIDAL, D. R. (1990): Proprietes immunosuppressives der mycotoxines du groupe des trichothecenes. Bull. Inst. Pasteur 88, 159-192.
- WYLLIE, T. D., L. G. MOREHOUSE (1977): Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses. Vol. 1. Mycotoxic Fungi and Chemistry of Mycotoxins. New York.

GRAF 2: Komparacija rezultata kožnog testa na kuniču i koncentracija STR i TOL-a uzorcima kukuruza



ZAKLJUČAK

Na osnovi opisanih istraživanja možemo zaključiti da su u našim ekološkim uvjetima mikotoksini iz grupe trihotecena među najnačajnijim i najčešćim mikotoksinima u stočnoj hrani. Uska korelacija između kožnog testa na dermatoksičnost i koncentracije dermatoksičnih trihotecena u krmivima pokazuje da bi bilo potrebno obavezno provoditi testiranje na dermatoksičnost svih krmiva i krmnih smjesa koje nisu higijenski ispravne zbog prevelike kontaminacije gljivicama ili su sumnjive, da su uzrokovale zdravstvene ili proizvodne poremećaje kod domaćih životinja.



SUMMARY

The contamination of feeds with mycotoxins from trichothecene group was studied. The detection of trichothecene was performed by the skin test on rabbits, with thin layer chromatography and gas liquid chromatography. The best results were achieved with alkaline hydrolysis of toxins where a great number of trichothecenes of group A and B and their metabolites were converted to their corresponding alcohols scirpentriol (STR), deoxynivalenol (DON) and T-2 tetraol (TOL). Separation of trichothecenes was carried out by capillary gas chromatography with electron capture detector and identification of toxins was confirmed by mass spectrometry. Detection limit for mentioned toxins from 10 $\mu\text{g/g}$ for normal corn to 100 $\mu\text{g/g}$ for very mouldy corn was estimated. In 26 samples of mouldy corn DON and its metabolites were the most frequent (72%) in average concentration of 9,49 mg/kg (from 0,08 to 16,0 mg/kg). DAS and its metabolites in 44% of cases in average of 0,36 mg/kg (from 0,02 to 4,30 mg/kg). Besides trichothecenes in 50% of samples F-2 toxin in concentration from 0,50 to 12,10 mg/kg, aflatoxin B₁ in three samples (0,004 to 0,030 mg/kg) and ochratoxin in one sample (0,02 mg/g) were also found. By TLC method smaller percentage of contaminated feeds was stated because of lower sensitivity of method and detection of T-2 toxin, DAS and DON only. Comparison between intensity of skin reaction and GLC estimated content of dermatotoxic trichothecene showed a strong correlation ($r = 0,60$, $P < 0,005$). In no sample without or with weak dermatotoxic effect greater quantities of dermatotoxic toxins were chemically stated.