



PREGLEDNI RAD

T-2 i HT-2 toksini u hrani i hrani za životinje: Pojavnost, toksičnost i mjere prevencije i dekontaminacije

Maja Kiš¹, Jelka Pleadin^{2*}¹ Hrvatski veterinarski institut, Veterinarski zavod Križevci, Zakmardijeva 10, 48260 Križevci, Hrvatska² Hrvatski veterinarski institut, Savska cesta 143, 10 000 Zagreb, Hrvatska

*Corresponding author: pleadin@veinst.hr

Sažetak

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni koji imaju toksičan učinak na zdravlje ljudi i životinja. Smatraju se neizbježnim onečišćivačima hrane i hrane za životinje, a predstavljaju problem u cijelom svijetu jer se njihova koncentracija ne smanjuje ni nakon uobičajenih postupaka prerade hrane. T-2 toksin i njegov glavni metabolit HT-2 pripadaju velikoj grupi trihotecenskih mikotoksina. T-2 toksin se smatra najtoksičnijim predstavnikom trihotecenskih mikotoksina tipa A, a proizvode ga plijesni roda *Fusarium*, načešće *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae* i *Fusarium sporotrichioides*. Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) je uvrstila T-2 toksin u skupinu 3, među spojeve koji se ne mogu klasificirati kao ljudski karcinogeni. Ipak, izraženo citotoksično, imunosupresivno i hematotoksično djelovanje T-2 i HT-2 toksina može uzrokovati kronične bolesti kod ljudi i životinja. Daljnja istraživanja ovih mikotoksina su nužna s obzirom na nedostatak toksikoloških podataka te kako bi se odredila njihova prisutnost u hrani i hrani za životinje i efikasne metode dekontaminacije onečišćenih sirovina i proizvoda. Kako bi se izbjegli negativni učinci T-2, HT-2 toksina i ostalih trihotecenskih mikotoksina na zdravlje ljudi i životinja, važno je sprječavanje rasta plijesni i sustavan nadzor sirovina i finalnih proizvoda namijenjenih prehrani ljudi i hranidbi životinja.

Ključne riječi: T-2 toksin, HT-2 toksin, toksičnost, pojavnost, dekontaminacija, hrana, hrana za životinje

Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi that can cause toxic effects on the health of humans and animals. They represent a worldwide problem because of the inevitable contamination of food and feed and their resistance during conventional food-processing. T-2 toxin and its major metabolite HT-2 belong to the large group of trichothecene mycotoxins. T-2 toxin is the most toxic member of the type A trichothecenes and is produced by fungi of the genus *Fusarium*, especially *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides*. International Agency for Research on Cancer (IARC) classified T-2 toxin in group 3, as the compound that can not be classified as a human carcinogen. However, T-2 and HT-2 are very potent cytotoxic, haematotoxic and immunosuppressive toxins, which can cause several chronic diseases in both humans and animals. Further research of these toxins are required because of the scarcity of data on toxicology, bioavailability in food and feed, and efficient methods for their decontamination from food and feed. In order to avoid the negative effects of T-2, HT-2 toxins and other trichothecenes on animal and human health, it is necessary to prevent growth of moulds and to ensure systematic monitoring of raw materials and finished products intended for human consumption or animal feed production.

Keywords: T-2 toxin, HT-2 toxin, toxicity, prevalence, decontamination, food, feed

Uvod

Mikotoksini su spojevi niske molekularne mase koji se sintetiziraju tijekom sekundarnog metabolizma filamentoznih plijesni. Plijesni koje proizvode mikotoksine, najčešće iz rodova *Fusarium*, *Aspergillus* i *Penicillium*, su prirodno prisutne na žitaricama, a stupanj kontaminacije žitarica mikotoksinima ovisi o okolišnim uvjetima. Do kontaminacije mikotoksinima može doći prije žetve ili tijekom pohrane žitarica zbog neodgovarajućih uvjeta skladištenja. Na proizvodnju mikotoksina utječu brojni čimbenici, kao što su klimatski uvjeti, mehaničko oštećenje žitarica, brzina i način sušenja, uvjeti skladištenja, prisutnost kukaca, kemijska obrada i dr. (Placinta i sur., 1999; Binder, 2007; Pleadin i sur., 2016).

Trihotecenski mikotoksini predstavljaju skupinu od gotovo 190 kemijski sličnih toksina koje proizvode plijesni iz taksonomski različitih rodova kao što su *Fusarium*, *Myrothe-*

cium, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* i *Stachybotrys*. Trihoteceni se dijele na četiri tipa, ovisno o prisutnosti karakterističnih funkcionalnih grupa. Trihotecene tipa A karakterizira odsutstvo karbonilne grupe na C-8, a glavni predstavnici su T-2, HT-2 toksini i diacetoksiscirpenol (DAS). Kod tipa B je karbonilna grupa prisutna na C-8 (deoksinivalenol (DON), nivalenol). Trihoteceni tipa C sadrže epoksidni prsten između C-7 i C-8 ili C-9 i C-10 (krotocin, bakarin). Satratoksin i roridin su predstavnici tipa D kod kojih se makrociklički prsten nalazi između C-4 i C-15 (Li i sur., 2011).

Proizvodnji trihotecenskih mikotoksina najbolje pogoduje vlažna tropska klima s visokom vlagom zraka i širokim rasponom temperature od 6-24 °C. Od trihotecenskih mikotoksina je DON najčešći kontaminant hrane i hrane za životinje, dok se T-2 toksin i DAS pojavljuju puno rjeđe. Glavni izvor trihotecena u hrani i hrani za životinje su pšenica, kukuruz i ječam. Također, ulaze u prehrambeni lanac putem mlijeka, mesa i jaja

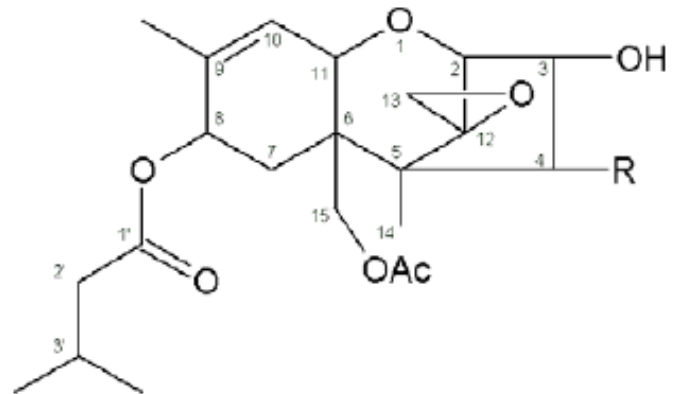
dobivenih od životinja koje se hrane kontaminiranom hranom. Predstavljaju kemijski i toplinski vrlo stabilne spojeve, otporne na različite uvjete prerade i proizvodnje (He i sur., 2010; Bosco i Mollea, 2012).

T-2 toksin je najtoksičniji predstavnik trihotecenskih mikotoksina tipa A i općenito fuzarijskih mikotoksina. Najčešće ga proizvode plijesni roda *Fusarium* kao što su *F. acuminatum*, *F. nivale*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. sporotrichoides* i *F. solani* koje mogu kontaminirati različite vrste žitarica i rasti u područjima s hladnom klimom. T-2 toksin proizvode i plijesni rodova *Trichoderma* i *Myrothecium*. Plijesni roda *Fusarium* su najčešći kontaminanti žitarica u područjima s umjerenom klimom, a prisutnost T-2/HT-2 toksina opisana je u cijelom svijetu. Dominantno su prisutni u tropskim i suptropskim područjima gdje topli i vlažni klimatski uvjeti, uz nepravilno skladištenje žitarica s visokim sadržajem vlage, mogu dovesti do značajne kontaminacije. Faktori koji najviše utječu na proizvodnju T-2 toksina su klimatski uvjeti, mehaničko oštećenje zrna i visoki sadržaj vlage (Li i sur., 2011; Schuhmacher-Wolz i sur., 2010). Plijesni roda *Fusarium* proizvode T-2 toksin u širokom temperaturnom rasponu od 0-32 °C, uz maksimalnu proizvodnju pri temperaturama ispod 15°C. Iako se T-2 pojavljuje na različitim žitaricama poput kukuruza, pšenice, raži, ječma i zobi (Langseth i Rundberget, 1999; Sokolović i sur., 2008; Vulić i sur., 2011), veće količine su određene u neprerađenim žitaricama u odnosu na prerađene, a visoka pojavnost zamijećena je u zobi i proizvodima od zobi (Pleadin i sur., 2016).

Broj istraživanja o pojavnosti, toksičnosti i metodama redukcije T-2 toksina, a posebice HT-2 toksina, je značajno manji u odnosu na druge mikotoksine te su dostupni podaci o njihovoj pojavnosti ograničeni. U ovom radu dan je pregled svojstava, mehanizma djelovanja i toksičnih učinaka T-2 i HT-2 toksina. Opisana je njihova pojavnost u žitaricama, analitičke metode koje se koriste u detekciji i kvantifikaciji te preventivne mjere i načini dekontaminacije hrane i hrane za životinje.

Struktura i fizikalno – kemijska svojstva

Zajedničko svojstvo trihotecenskih mikotoksina, pa tako i T-2 toksina, je niska molekulska masa, osnovna prstenasta struktura i karakteristična 12,13-epoksidna grupa, koja je odgovorna za njihovu toksičnost. T-2 toksin je nehlapljiva i termostabilna molekula koju je teško suzbiti u proizvodnji hrane (Creppy, 2002). Netopljiv je u vodi i petroleteru, a topljiv u acetonu, etilacetatu, kloroformu, etanolu, metanolu, propilenglikolu. Otporan je na djelovanje topline i UV zraka te se vrlo teško inaktivira tijekom uobičajenih postupaka prerade hrane ili autoklaviranja. T-2 toksin se razgrađuje zagrijavanjem pri temperaturama od 200-210 °C tijekom 30-40 minuta, a učinkovita je i primjena otopina natrijevog hidroksida i natrijevog hipoklorita (Adhikari i sur., 2017).



Slika 1. Strukturna formula T-2 ($R=OAc$) i HT-2 toksina ($R=OH$) (Schuhmacher-Wolz i sur., 2010)

Figure 1. Structural formula of T-2 ($R=OAc$) i HT-2 toxin ($R=OH$) (Schuhmacher-Wolz i sur., 2010)

Razlika između T-2 i HT-2 toksina je u funkcionalnoj grupi na C-4 atomu (slika 1). Hidrolizom acetatne skupine i procesom deacetilacije dolazi do smanjenja toksičnosti T-2 toksina i konverzije u manje toksičan HT-2. Broj istraživanja o pojedinačnoj toksičnosti HT-2 toksina je značajno manji u odnosu na T-2 toksin te su dostupni podaci o njegovoj toksičnosti vrlo ograničeni. Pošto se T-2 vrlo brzo metabolizira u HT-2 tijekom procesa probave, toksični učinci T-2 toksina *in vivo* uključuju i djelovanje HT-2 toksina (Schuhmacher-Wolz i sur., 2010).

Toksikokinetika

T-2 toksin se vrlo brzo apsorbira u organizam bez obzira na način primjene te ne zahtijeva metaboličku aktivaciju za nastanak toksičnih učinaka. Nakon kontakta toksina s kožom ili nakon oralne ingestije, T-2 uzrokuje neposrednu iritaciju kože ili sluznice probavnog sustava. Kod svinja su tragovi T-2 toksina u krvi zabilježeni već pola sata nakon izloženosti (Eriksen i Pettersson, 2004). Vrlo se brzo distribuira u organizmu te prolazi kroz placentu i krvno-moždanu barijeru. Izlučivanje T-2 toksina iz organizma odvija se većinom putem urina i žuči bez kumulacije u tkivima. T-2 toksin se brzo metabolizira procesima deacetilacije, hidroksilacije, konjugacije glukoronida i deepoksidacije. Glavni biotransformacijski put T-2 toksina je reakcija deacetilacije C-4 acetilne grupe u kojoj sudjeluju nespecifične mikrosomalne esterase jetre, bubrega i slezene pri čemu nastaje manje toksični HT-2 toksin (Rachitha i Khanum, 2014). Pritom uz nastanak HT-2 toksina nastaju i drugi metaboliti kao što su T-2 triol, T-2 tetraol, neosolaniol, 3-hidroksi T-2, 3- hidroksi HT-2 toksin. Metabolički put nastanka 3-hidroksi T-2 toksina se smatra aktivacijskim putem jer ovaj metabolit pokazuje još veću toksičnost od T-2 toksina (Schuhmacher-Wolz i sur., 2010).

Mehanizam djelovanja

Toksičnost T-2 toksina potječe od njegove sposobnosti inhibicije sinteze proteina, sinteze DNA i RNA, peroksidacije stanične membrane i uzrokovanja apoptoze stanice. T-2 toksin



inhibira sintezu proteina već u početnoj fazi kada se veže na 60S ribosomsku podjedinicu i inhibira aktivnost peptidil transferaze. Brojne su studije zabilježile inhibiciju sinteze proteina kod staničnih kultura sisavaca u *in vitro* uvjetima. Istraživanja provedena na štakorima su pokazala da izloženost hepatocita koncentraciji T-2 toksina od 0,01 ng/mL dovodi do 75% inhibicije sinteze proteina (Rosenstein i Lafarge-Frayssinet, 1983). Istraživanja utjecaja T-2 toksina na inhibiciju sinteze proteina u *in vivo* uvjetima provedena su na mišiću, srcu, jetri i slezeni štakora (Schuhmacher-Wolz i sur., 2010; Rachitha i Khanum, 2014).

T-2 toksin je amfifilna molekula koja prolazi kroz staničnu membranu i uzrokuje lipidnu peroksidaciju oslobađanjem slobodnih radikala. Lipidna peroksidacija je pokazatelj oksidativnog stresa u stanici čija se razina može pratiti mjerenjem razine reaktivnih oblika kisika (ROS) i antioksidativnih molekula (glutation). Inhibicija sinteze DNA i RNA u *ex vivo* staničnim kulturama slezene, timusa i koštane srži miša zabilježena je nakon izloženosti dozama od 0,75 mg/kg tjelesne težine (Schuhmacher-Wolz i sur., 2010). Postoje različite teorije koje objašnjavaju mehanizme kojima T-2 uzrokuje apoptozu stanice (Jaradat, 2005). Smatra se da oštećenja DNA, koja nastaju kao posljedica oksidativnog stresa ili inhibicije sinteze proteina, mogu aktivirati mitohondrijske puteve apoptoze i dovesti do stanične smrti. Faktori koji dovode do apoptoze, kao citokrom c iz mitohondrija, i povećana aktivnost specifičnih proteaza pokreću proces apoptoze u stanici. Prema drugoj teoriji, do stanične smrti dolazi nakon indukcije mitogenom-aktivirane protein kinaze (p38/MAPK) i protein kinaze aktivirane stresom (SAPK/JNK) koje nastaju zbog inhibicije proteina ili lipidne peroksidacije i oslobađanja slobodnih radikala. T-2 i HT-2 toksini uzrokuju apoptozu posebno kod brzo proliferirajućih staničnih tipova (hematopoetska, limfoidna i gastrointestinalna tkiva) (Jaradat, 2005; Schuhmacher-Wolz i sur., 2010).

Toksični učinci u organizmu

Istraživanja akutne toksičnosti pokazala su da T-2 toksin ima izrazito citotoksično, hematotoksično i imunosupresivno djelovanje. Toksični učinak T-2 ovisi o vrsti, dobi, spolu i zdravstvenom stanju životinje, načinu unosa toksina u organizam, dozi i trajanju izlaganja. Toksični efekt T-2 toksina očituje se gubitkom težine, smanjenjem broja krvnih stanica i leukocita, patološkim promjenama na jetri i želucu. Akutna izloženost T-2 toksinu dovodi do povraćanja, proljeva, krvarenja, stanja opće slabosti, oštećenja hrskavičnih tkiva, apoptoze i smrti. Također, T-2 toksin se povezuje s pojavom alimentarne toksične aleukije (ATA) i Kashin Beckove bolesti, a imunosupresivno djelovanje omogućava povećanje stope raznih infekcija i dovodi do uginuća životinja (Li i sur., 2011). Glavni klinički simptomi ATA uključuju progresivnu leukopeniju, granulopeniju i limfocitozu. Istraživanja provedena na mačkama i majmunima kao pokusnim životinjama pokazala su da davanje T-2 toksina izoliranog iz *F. sporotrichioides* uzrokuje nastanak ATA (Duraković i Duraković, 2003).

Smatra se da je krvotvorni sustav (posebice koštana srž) najviše izložen toksičnom djelovanju T-2 toksina (WHO, 2001). Toksičnost T-2 za pojedine pokusne životinje prikazane kao LD₅₀ vrijednost (tablica 1) kreće se u rasponu 0,9 – 10,0 mg/kg tjelesne mase, a ovisi o vrsti, dobi, spolu životinje, dozi i načinu primjene. Supkutanom, intravenoznom ili intramuskularnom primjenom T-2/HT-2 toksina kod miša zabilježene su vrijednosti LD₅₀ oko 6 mg/kg tjelesne težine, a kod štakora oko 1 mg/kg tjelesne težine. Nakon prvog oralnog tretmana kod štakora zabilježeno je povećanje lipidnih peroksida u jetri (Schuhmacher-Wolz i sur., 2010). Kod pokusa sa štakorima koji su izloženi dozama 3,0 i 5,0 mg T-2 /kg uočeni su znakovi limfopenije i retikulocitoze (Fairhurst i sur., 1987). Zamijećene su promjene u aktivnosti alkaline fosfataze i aspartat aminotransferaze, dok su u timusu i limfnim čvorovima zabilježeni ozbiljni znakovi oštećenja (Li i sur., 2011). Međunarodna agencija za istraživanje raka uvrstila je T-2 toksin u skupinu 3, među spojeve koji se ne mogu klasificirati kao ljudski karcinogeni, zbog nedovoljnog postojanja relevantnih dokaza za karcinogenost kod ljudi i životinja (IARC, 1993).

Tablica 1. Toksičnost (LD₅₀) T-2 toksina kod pokusnih životinja (WHO, 2001; Schuhmacher-Wolz i sur., 2010; Adhikari i sur., 2017)

Table 1. Toxicity (LD₅₀) of T-2 toxin in experimental animals (WHO, 2001; Schuhmacher-Wolz i sur., 2010; Adhikari i sur., 2017)

Vrsta životinje	Način unosa toksina u organizam		
	Oralno (mg/kg)	Intravenozno (mg/kg)	Intraperitonealno (mg/kg)
miševi	10,0	4,2	5,2
štakori	3,7	0,9	1,5
zamorci	-	1-2	1,2
kokoši nesilice	6,3	-	-
jednodnevni pilići	5,0	-	-
svinje	5,0	1,2	-

Akutna izloženost T-2 toksinu kod kunića izaziva patološke i histopatološke promjene u probavnom traktu, limfociti-

ma i koštanoj srži. Subakutna izloženost dovodi do upale ovojnice želuca, mršavljenja i hipertrofije nadbubrežne žlijezde

(Glavits i sur., 1989). Istraživanjem provedenim na štakorima dokazano je da T-2 i HT-2 toksini uzrokuju iritaciju kože i pojavu vaskularne dilatacije, edema i infiltracije mononuklearnih stanica (WHO, 2001). Kod štakora su znakovi iritacije primijećeni već pri koncentraciji 0,5 µg T-2/cm² kože (Sudakin, 2003).

Kronična i akutna izloženost T-2 toksinu pokazuju različite simptome toksičnosti. Prvi znakovi kronične toksičnosti T-2 kod peradi su pojava lezija u ustima i probavnom sustavu, a nastaju već pri koncentraciji nižoj od 1 mg/kg T-2 u hrani. Pri višim koncentracijama javlja se i imunosupresivni učinak (Sokolović, 2005; Schuhmacher-Wolz i sur., 2010). U istraživanjima kronične toksičnosti na kokošima zabilježen je slabiji prirast, proizvodnja jaja i slabija kvaliteta ljuske jaja, a kod purana, gusaka i pataka smanjena valivost oplođenih jaja (Sokolović, 2005; Pande i sur., 2006). U serumu kokoši dolazi do smanjenja ukupnih proteina i kolesterola, a povećava se razina laktat dehidrogenaze i mokraćne kiseline. T-2 toksin može uzrokovati promjene u kvaliteti perja peradi (Li i sur., 2011). Dodatak 10 mg T-2 /kg u prehranu kokoši rezultirao je fragmentacijom DNA leukocita slezene. Proučavanjem razine oksidativnog stresa zamijećen je smanjeni antioksidativni status i porast koncentracije malonildialdehida u plazmi i jetri (Frankić i sur., 2006). T-2 toksin ima štetno djelovanje na koncentraciju jetrenih enzima kod sisavaca, posebno nakon izloženosti visokim dozama. Povećanje jetrenih enzima se često zamijećuje u ranijim fazama istraživanja, dok se kasnije bilježi smanjenje njihove koncentracije kao posljedica potrošnje stanične zalihe enzima (Schuhmacher-Wolz i sur., 2010).

Istraživanjima na ljudskim stanicama utvrđeno je da T-2/HT-2 toksini smanjuju stanični rast i utječu na sintezu hemoglobina. Zabilježene su promjene u porfirinskom prstenu i koncentraciji hemoglobina. T-2 toksin je izravno citotoksičan, utječe na humoralni i stanični imunološki odgovor, uzrokuje leukopeniju (WHO, 2001).

T-2 toksin ima sposobnost prelaska kroz placentu i ulaska u tkivo embrija (fetus). Istraživanja na gravidnim miševima i štakorima su pokazala da prisutnost T-2 u prehrani dovodi do krvarenja i smrtnosti ženke (Lafarge-Frayssinet i sur., 2011). Kod fetusa je zamijećena povećana smrtnost, oštećenja mozga i malformacije kostiju. T-2 toksin također štetno djeluje na sintezu testosterona i spermatogenezu (Schuhmacher-Wolz i sur., 2010). Hranjenjem gravidnih štakora niskim koncentracijama T-2 koje su često prirodno prisutne u žitaricama zamijećena su oštećenja imunološkog sustava kod potomaka. Smatra se da je mehanizam toksičnosti T-2 kod gravidnih životinja povezan s ekspresijom gena koji dovode do apoptoze i gena oksidativnog stresa (Lafarge-Frayssinet i sur., 2011).

Pojavnost u hrani i hrani za životinje

Broj istraživanja o pojavnosti T-2 i HT-2 toksina je značajno manji u odnosu na druge mikotoksine, te su podaci o njihovoj pojavnosti vrlo ograničeni. Na području Europe je prisutnost T-2 i HT-2 toksina kao prirodnih kontaminanata hrane i hrane za životinje najznačajnija u kukuruzu, ječmu, zobu, pšenici i soji. Istraživanje provedeno u osam europskih zemalja na više od 3000 uzoraka je potvrdilo kontaminaciju T-2 toksinom kod 20% uzoraka. Najčešće kontaminirane žitarice su bile kukuruz (28%), pšenica (21%) i zob (21%). Prisutstvo HT-2

toksina je utvrđeno u uzorcima zobi (41%), kukuruza (24%) i raži (17%) (EK, 2003). Zabilježene koncentracije T-2 toksina u žitaricama i hrani za životinje na području Europe široko variraju, a pojedina istraživanja ukazuju na značajne vrijednosti onečišćenja, i do 2406 µg/kg (Edwards, 2009). Istraživanje Morcia i sur. (2016) pokazalo je da se učestalost kontaminacije ječma s T-2 toksinom za razdoblje od 2011. – 2014. godine kreće od 22 – 53% ukazujući time i na godišnje varijacije u pojavnosti. Zabilježene vrijednosti kreću se u rasponu od 26 do 787 µg/kg.

Ranija istraživanja pokazuju da klimatski uvjeti u Hrvatskoj pogoduju rastu plijesni iz roda *Fusarium*, te da je kontaminacija žitarica fuzarijskim mikotoksiniima moguća, posebice tijekom kišovityh i toplijih razdoblja (Pleadin i sur., 2012, 2013, 2017). U razdoblju od 1998. – 2004. zabilježena je pojavnost T-2 toksina u 16,8 % uzoraka hrane za životinje s vrijednostima u rasponu od 100 do 500 µg/kg (Sokolović i Šimpraga, 2006). U istraživanju provedenom na kukuruzu uzgojenom tijekom kišovityh razdoblja zabilježena je prisutnost T-2 toksina u 24,4% uzoraka (Pleadin i sur., 2012). Pleadin i sur. (2016) su analizom žitarica (n = 174) detektirali T-2 toksin u 40 % uzoraka, s najvećom količinom određenom u zobi (75,2 µg/kg). S obzirom na visoku pojavnost ovih mikotoksina i njihov toksični učinak, Europska komisija je u Preporuci 2013/165/EU od 27. ožujka 2013. državama članicama preporučila prikupljanje podataka o variranju godišnjih razina T-2 toksina s ciljem uspostave NDK (najveća dopuštena količina) za različite vrste hrane i hrane za životinje. Također, ovom Preporukom su definirane vrijednosti indikativnih razina T-2 i HT-2 toksina u žitaricama i proizvodima na bazi žitarica namijenjenih za uporabu kao hrana i hrana za životinje pri kojima je potrebno poduzimanje daljnjih mjera (EK, 2013). Znanstveni odbor za hranu je na temelju karakterizacije rizika odredio vrijednosti sigurne dnevne izloženosti (*Tolerable daily Intake – TDI*) za najznačajnije fuzarijske mikotoksine koja za zbroj T-2 i HT-2 toksina iznosi 0,06 µg/kg tjelesne težine (EK, 2003). Istovremena prisutnost više različitih mikotoksina može imati sinergistički učinak čije je djelovanje još uvijek neistraženo (Pleadin i sur., 2016).

Analitičke metode u detekciji

Rastući interes za područje istraživanja mikotoksina dovedo je do razvoja brzih i osjetljivih analitičkih metoda za njihovu detekciju u različitim matriksima. Za analizu T-2 i HT-2 toksina dostupne su brojne potvrđne i orijentacijske (*screening*) metode, a u većini slučajeva se koristi tekućinska (Liquid Chromatography – LC) ili plinska kromatografija (Gas Chromatography – GC) u kombinaciji s masenom spektrometrijom (MS) kao potvrđna metoda ili ELISA kao orijentacijska metoda. Prije provedbe većine analitičkih metoda u analizi hrane potrebno je provesti ekstrakciju T-2 i HT-2 toksina iz matriksa pomoću odgovarajućeg otapala te potom pročišćavanje uzorka (ekstrakcija na čvrstoj fazi - SPE, ekstrakcija tekuće-tekuće – LLE, imunoafinitetne kolone, QuEChERS).

Imunoenzimska metoda ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) je najznačajnija orijentacijska metoda za određivanje T-2 i HT-2 toksina. Metoda se temelji na reverzibilnom vezanju antigena (analit) i specifičnih antitijela, stvarajući an-



tigen-antitijelo kompleks, te spektrofotometrijskom mjerenju nastale reakcije (Turner i sur., 2009). ELISA metodu karakterizira brza i jednostavna analiza velikog broja uzoraka, visoka osjetljivost, automatiziranost analitičkog postupka, dostupnost reagensa i niski troškovi analize (Pleadin i sur., 2014). Učinkovitost ove metode ovisi o kvaliteti korištenih antitijela, a zbog mogućnosti *cross*-reakcija s konjugiranim metabolitima nužna je primjena potvrdnih metoda (Li i sur., 2011).

Potvrđne metode iziskuju korištenje sofisticirane laboratorijske opreme i omogućuju selektivno određivanje mikotoksina. U suvremenoj analitici najveću primjenu ima HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) s fluorescentnim detektorom (FLD) ili kombinirana tehnika s detekcijom mase spektrometrijom (HPLC-MS/MS), te GC.

Prevenција i dekontaminacija

S ciljem prevencije ulaska trihotecenskih mikotoksina u prehrambeni lanac provode se postupci sprečavanja njihovog nastanka u žitaricama, detoksikacija kontaminiranih krmiva i inhibicija apsorpcije u gastrointestinalnom traktu (He i sur., 2010). Žitarice predstavljaju vrlo pogodan supstrat za rast plijesni i onečišćenje mikotoksinima. Mjere sprečavanja kontaminacije provode se u nekoliko kritičnih točaka prije nego dođe do infekcije plijesnima: prije, tijekom i nakon žetve. Kontaminacija se često ne može u potpunosti spriječiti i postoje različite preventivne mjere kako bi se ona ublažila i svela na najmanju moguću razinu. Neke od preventivnih mjera uključuju agrotehničke mjere, odabir sorti žitarica otpornih na infekciju plijesnima, ranu sjetvu, navodnjavanje tijekom suhih i vrućih klimatskih perioda, upotrebu fungicida, primjenu plodoreda, smanjenje oštećenja zrna uzrokovanih insektima i adekvatno skladištenje uz optimalnu temperaturu i vlažnost žitarica. Sprečavanje nastanka mikotoksina u polju i dalje se smatra najboljom preventivnom mjerom (Binder, 2007; Hojnik i sur., 2017).

Primjenom sigurnih i učinkovitih metoda dekontaminacije onečišćenih proizvoda mikotoksini se inaktiviraju ili u potpunosti uklanjaju, bez narušavanja nutritivnih i tehnoloških svojstava proizvoda, pritom ne stvarajući reaktivne toksične produkte. Uklanjanje trihotecenskih mikotoksina iz kontaminirane hrane može se provoditi fizikalnim, kemijskim i biološkim metodama (He i sur., 2010). Tradicionalne fizikalne mjere dekontaminacije podrazumijevaju pranje, prosijavanje, sortiranje, ljuštenje, mljevenje i primjenu visokih temperatura. Prema rezultatima Schwake-Anduschus i sur. (2010), uklanjanjem vanjske ovojnice žitarica i ljuštenjem zobi može se postići redukcija koncentracije T-2 i HT-2 za više od 90%, dok kuhanjem i pečenjem ne dolazi do značajnih promjena u koncentraciji ovih mikotoksina. Učinkovitost termalnih metoda dekontaminacije je ograničena zbog otpornosti T-2 i HT-2 toksina na temperature koje se uobičajeno primjenjuju kod pripreme hrane (80-121 °C) i ovisi o relativnoj distribuciji mikotoksina i razini kontaminacije hrane i hrane za životinje. Temperature iznad 200 °C dovode do termalne razgradnje mikotoksina, ali utječu i na kvalitetu tretiranog proizvoda (Adhikari i sur., 2017).

Nove netermalne fizikalne metode poput primjene UV, x i γ -zraka, mikrovalova i hladne atmosferske plazme pokazale su se učinkovitima u degradaciji mikotoksina. One djeluju na

kemijsku strukturu mikotoksina, a ovisi o prisutnosti vode u žitaricama (Hojnik i sur., 2017). Tretman γ -zračenja različitih žitarica reducira koncentracije zearalenona za 25%, DON-a za 33% i T-2 toksina za 16% (Hooshmand i Klopfbstein, 1995). Utvrđeno je da se T-2 toksin potpuno raspada nakon 10 sekundi tretmana hladnom atmosferskom plazmom (Bosch i sur., 2017).

Dodatkom vezivnih sredstava u hranu za životinje smanjuje se bioraspoloživost mikotoksina kod životinja. Bentonit se pokazao kao učinkovito sredstvo za vezivanje i redukciju aflatoksina, zearalenona i T-2 toksina. Dodatkom 5-10% bentonita na kilogram hrane za životinje, toksični učinci T-2 toksina se inhibiraju smanjenjem apsorpcije u probavnom sustavu (Adhikari i sur., 2017). Ipak, primjena adsorptivnih tvari može biti upitna jer predstavlja rizik za okoliš i zdravlje životinja zbog smanjenja bioraspoloživosti vitamina i minerala iz prehrane (Hojnik i sur., 2017).

Kemijske i biološke metode dovode do promjena u molekularnoj strukturi trihotecena čime se mijenja njihova biološka aktivnost. Kemijske mjere redukcije podrazumijevaju primjenu različitih kemijskih sredstava poput kiselina, baza, oksidirajućih i reducirajućih sredstava, formaldehida. Trihotecenski mikotoksini se transformiraju u spojeve manje toksičnosti reakcijama alkalizacije, oksidacije, redukcije, hidrolize, hidratacije i konjugacije (He i sur., 2010). Kloridna sredstva poput NaClO inhibiraju biološku aktivnost T-2 toksina i koriste se za dekontaminaciju trihotecenskih mikotoksina (Adhikari i sur., 2017). Zbog potencijalne opasnosti koja se javlja primjenom kemikalija i njihovog negativnog utjecaja na nutritivne, organoleptičke i funkcionalne karakteristike proizvoda, sve je veći naglasak na primjeni bioloških metoda dekontaminacije. One se temelje na sposobnosti bakterija, kvasaca, plijesni, aktinomyceta i algi da biološki transformiraju, enzimski razgrade ili modificiraju mikotoksine u spojeve manje toksičnosti. Utvrđeno je da nova funkcionalna bakterija *Eggerthella* sp. DII-9 ima sposobnost deepoksidacije HT-2 toksina i metabolita T-2 triola i T-2 tetraola (Gao i sur., 2018). Također, dodatkom bakterije *Eubacterium* sp. BBSH 797 u prehranu životinja dolazi do značajnog smanjenja štetnog učinka T-2 toksina na piliće i DON-a na svinje i mliječne krave. Ovaj bakterijski soj izoliran je iz rumena preživača i prvi je komercijalno dostupan proizvod za redukciju trihotecenskih mikotoksina odobren u Europskoj uniji (EFSA, 2005).

Iako postoje brojna istraživanja o kemijskoj i biološkoj transformaciji trihotecenskih mikotoksina, primjena metoda detoksifikacije je ograničena zbog nedovoljnog poznavanja mehanizama transformacije mikotoksina, toksičnosti dobivenih produkata i utjecaja nastalih reakcija na nutritivna svojstva hrane i hrane za životinje (He i sur., 2010).

Zaključci

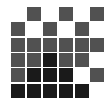
Uzevši u obzir utvrđenu izrazitu toksičnost T-2 i HT-2 toksina te konačni cilj sigurnosti hrane i zaštite zdravlja ljudi i životinja potrebno je daljnje prikupljanje podataka o prisutnosti ovih mikotoksina u hrani i hrani za životinje. Analitičko određivanje treba uključivati utvrđivanje pojedinačnih vrijednosti T-2 i HT-2 toksina, te njihovih odnosa, uz primjenu visoko osjetljivih potvrdnih analitičkih tehnika. U istraživa-



njima trebaju biti obuhvaćene različite žitarice i proizvodi na bazi žitarica, posebno zob i proizvodi na bazi zobi u kojima je do sada utvrđena najveća razina T-2 i HT-2 toksina. Nadalje, potrebno je istražiti učinke prerade hrane na prisutnost toksina T-2 i HT-2 te dobiti više informacija o različitim faktorima, kao što su meteorološke prilike, koji dovode do relativno visokih razina ovih mikotoksina u žitaricama i proizvodima od žitarica. Podaci trebaju poslužiti za uspostavu najvećih dopuštenih količina T-2 i HT-2 toksina u različitim kategorijama hrane i hrane za životinje te u cilju identifikacije mjera koje je potrebno poduzeti za izbjegavanje ili smanjivanje njihove prisutnosti.

Literatura

- Adhikari, M., Negi, B., Kaushik, N., Adhikari, A., Al-Khedhairi, A.A., Kaushik, N.K., Choi, E.H. (2017) T-2 mycotoxin: toxicological effects and decontamination strategies. *Oncotarget*, 8 (20) 33933-33952.
- Binder, E.M. (2007) Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*, 133 149-166.
- Bosch, L., Pfohl, K., Avramidis, G., Wieneke, S., Viol, W., Karlovsky, P. (2017) Plasma-based Degradation of Mycotoxins Produced by *Fusarium*, *Aspergillus* and *Alternaria* Species. *Toxins*, 9 97.
- Bosco, F., Mollea, C. (2012) Mycotoxins in Food. U: Food Industrial Processes - Methods and Equipment (Valdez, B., ured.), InTech, 169-200.
- Creppy, E. (2002) Update on survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127 19-28.
- Duraković, S., Duraković, L. (2003) Mikologija u biotehnologiji. Kugler, Zagreb.
- Edwards, S.G. (2009) *Fusarium* mycotoxin content of UK organic and conventional oats. *Food Additives and Contaminants*, 26 (07) 1063-1069.
- EFSA – European Food Safety Authority (2005) Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on a request from the Commission on the safety of the product “Biomin BBSH 797” for piglets, pigs for fattening and chickens for fattening. *The EFSA Journal*, 169 1-14.
- EK, Europska komisija (2003) Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. Report on Task for Scientific Cooperation (SCOOP) 3.2.10, EC, Brussels. <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_contaminants_catalogue_fusarium_task3210.pdf>. Pristupljeno siječanj 2018.
- EK, Europska Komisija (2013) Preporuka komisije od 27. ožujka 2013. o prisutnosti toksina T-2 i HT-2 u žitaricama i proizvodima od žitarica. (2013/165/EU).
- Eriksen, G.S., Pettersson, H. (2004) Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 114 205-239.
- Fairhurst, S., Marrs, T.C., Parker, H.C., Scawin, J.W., Swanston, D.W. (1987) Acute toxicity of T2 toxin in rats, mice, guinea pigs, and pigeons. *Toxicology*, 43 31-49.
- Frankić, T., Pajk, T., Rezar, V., Levart, A., Salobir, J. (2006) The role of dietary nucleotides in reduction of DNA damage induced by T-2 toxin and deoxynivalenol in chicken leukocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 44 1838-1844.
- Gao, X., Mu, P., Wen, J., Sun, Y., Chen, Q., Deng, Y. (2018) Detoxification of trichothecene mycotoxins by a novel bacterium, *Eggerthella* sp. DII-9, *Food and Chemical Toxicology*, doi: 10.1016/j.fct.2017.12.066.
- Glavits, R., Vanyi, A., Fekete, S., Tamas, J. (1989) Acute toxicological experiment of T-2 toxin in rabbits. *Acta Veterinaria Hungarica*, 37 75-79.
- He, J., Zhou, T., Young, J.C., Boland, G.J., Scott, P.M. (2010) Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21 67-76.
- Hojnik, N., Cvelbar, U., Tavčar-Kalcher, G., Walsh, J.L., Križaj, I. (2017) Mycotoxin Decontamination of Food: Cold Atmospheric Pressure Plasma versus “Classic” Decontamination. *Toxins*, 9 151.
- Hooshmand, H., Klopfbstein, C.F. (1995) Effects of gamma irradiation on mycotoxin disappearance and amino acid contents of corn, wheat, and soybeans with different moisture contents. *Plant Foods for Human Nutrition*, 47 227-238.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (1993) Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Cancerogenic Risks to Humans*, volume 56.
- Jaradat, Z.W. (2005) T-2 mycotoxin in the diet and its effects on tissues. U: Watson R.R., Preedy V.R. (ed): Reviews in Food and Nutrition Toxicity, str. 173-212. CRC Press.
- Lafarge-Frayssinet, C., Chakor, K., Lafont, P., Frayssinet, C. (1990) Transplacental transfer of T2-toxin: pathological effect. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 10 64-68.
- Langseth, W., Rundberget, T. (1999) The occurrence of HT-2 and other trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia*, 147 157-165.
- Li, Y., Wang, Z., Beier, R.C., Shen, J., De Smet, D., De Saeger, S., Zhang, S. (2011) T-2 Toxin, a Trichothecene Mycotoxin: Review of Toxicity, Metabolism, and Analytical Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 3441-3453.
- Morcia, C., Tumino, G., Ghizzoni, R., Badeck, F.W., Lattanzio, V.M.T., Pascale, M., Terzi V. (2016) Occurrence of *Fusarium langsethiae* and T-2 and HT-2 Toxins in Italian Malting Barley. *Toxins*, 8 247.
- Pande, V.V., Kurkure, N.V., Bhandarkar, A.G. (2006) Effect of T-2 toxin on growth, performance and haematobiochemical alterations in broilers. *Indian Journal of Experimental Biology*, 44 86-88.
- Placinta, C.M., D’Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C. (1999) A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78 21-37.
- Pleadin, J., Kudumija, N., Frece, J., Zadavec, M., Mitak, M., Markov, K. (2016) Pojavnost fumonizina i T-2 toksina u neprocesiranim žitaricama malog i velikog zrna u Hrvatskoj. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 11 (1-2) 91-96.



Pleadin, J., Markov, K., Frece, J., Vulić, A., Perši, N. (2014) Bio-Prevalence, Determination and Reduction of Aflatoxin B1 in Cereals. U: Adina G. Faulkner (ed): Aflatoxins: Food Sources, Occurrence and Toxicological Effects, str. 1-34. Nova Science Publishers, USA.

Pleadin, J., Perši, N., Mitak, M., Zdravec, M., Sokolović, M., Vulić, A., Jaki, V., Brstilo, M (2012) The Natural Occurrence of T-2 Toxin and Fumonisin in Maize Samples in Croatia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88 863-866.

Pleadin, J., Vahčić, N., Perši, N., Ševelj, D., Markov, K., Frece, J. (2013) *Fusarium* mycotoxins' occurrence in cereals harvested from Croatian fields. *Food control*, 32 49-54.

Pleadin, J., Vasilj, V., Kudumija, N., Petrović, D., Vilišić, M., Škrivanko, M. (2017) Survey of T-2/HT-2 toxins in unprocessed cereals, food and feed coming from Croatia and Bosnia & Herzegovina. *Food Chemistry*, 224 153–159.

Rachitha, P., Khanum, F. (2014) T-2 mycotoxin induced toxicity: a review. *International Journal of Current Research*, 6 (12) 10798-10806.

Rosenstein, Y., Lafarge-Frayssinet, C. (1983) Inhibitory effect of *Fusarium* T-2 toxin on lymphoid DNA and protein synthesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 70 283-288.

Schuhmacher-Wolz, U., Heine, K., Schneider, K. (2010) Report on toxicity data on trichothecene mycotoxins HT-2 and T-2 toxins. CT/EFSA/CONTAM/2010/03.

Schwake-Anduschus, C., Langenkamper, G., Unbehend, G., Dietrich, R., Martlbauer, E., Munzing, K. (2010) Occurrence of *Fusarium* T-2 and HT-2 toxins in oats from cultivar studies in Germany and degradation of the toxins during grain cleaning treatment and food processing. *Food Additives and Contaminants*, 27 (9) 1253-1260.

Sokolović, M. (2005) Značaj trikotecenskih mikotoksina u hrani za perad. *Stočarstvo*, 59 (4) 289-300.

Sokolović, M., Garaj-Vrhovac, V., Šimpraga, B. (2008) T-2 toxin: incidence and toxicity in poultry. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 59 43-52.

Sokolović, M., Šimpraga, B. (2006) Survey of trichothecene mycotoxins in grains and animal feed in Croatia by thin layer chromatography. *Food Control*, 16 733-740.

Sudakin, D.L. (2003) Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters*, 143 97-107.

Turner, N.W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A. (2009) Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analitica Chimica Acta*, 632 168-180.

Vulić, A., Pleadin, J., Perši, N. (2011) Determination of T-2 and HT-2 Toxins in Commodities and Feed in Croatia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86 294-297.

WHO, World Health Organization (2001) Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food additives Series: 47. Prepared by the Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). < <http://www.fao.org/3/a-bc528e.pdf>>. Pristupljeno siječanj 2018.