

INCIDENȚA ȘI TRANSFERUL DEOXINIVALENOLULUI DIN FURAJE ÎN SER LA OVINE

APPEARANCE OF FEED DEOXYNIVALENOL IN SHEEP SERUM

ANDREEA ANGHEL¹, ALBERTO RITIENI², GIULIA GRAZIANI²,
FLORENTINA RADUCANU³, STELA ZAMFIRESCU¹

Abstract

The experiments that have been done so far regarding the incidence of mycotoxicoses have shown that all animal species are susceptible to being intoxicated with deoxynivalenol. Still, the degree of susceptibility varies according to each species, the differences being tracked down to differences in absorption, distribution, metabolism and elimination to the respective mycotoxin. Our experiments were based on creating a mycotoxicological profile which resided in investigating the degree of contamination with deoxynivalenol of the fodder given to animals and its transition into the animal serum. The determination of the levels of deoxynivalenol, both in the fodder and the serum, was done through the method of high-performance liquid chromatography (HPLC – UV detection; PDA detector), with the purification of the immuno-affinity column.

The concentration of deoxynivalenol determined in food was 41.54 µg/Kg, the maximum limit suggested by the EU Commission (The Codex Alimentarius Commission) being 1.25 mg/kg of unprocessed cereal, which means that the degree of contamination of feed does not exceed the stated legal limit.

Key words: DON, fodder contamination, HPLC, sheep.

INTRODUCERE

Contaminarea cerealelor, cafelei, condimentelor, arahidelor și a produselor derivate din acestea cu fusariotoxine a fost descrisă pe larg în literatura de specialitate, datorită implicațiilor acestora asupra sănătății animale și umane. Omul este expus acestor riscuri atât prin consumul de produse vegetale contaminate, cât și prin consumul unor produse provenite de la animale care au consumat hrană contaminată. Deoarece acest risc alimentar este considerat o problema de sănătate publică, se acordă o importanță din ce în ce mai mare

¹ Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Creșterea Ovinelor și Caprinelor Palas, județul Constanța, e-mail: palaslr@canals.ro

² Università degli Studi di Napoli Federico II, Italia

³ Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Agricolă Fundulea, 915200 Fundulea, județul Călărași, Romania

problematicii cu privire la căile de metabolizare a micotoxinelor în organismul animal și cel uman.

Deoxinivalenolul este fusariotoxina cu cea mai mare răspândire în cereale și în produsele derivate din acestea. Prin mecanisme ca inducerea apoptozei la celulele hematopoetice și imunitare, alterarea imunoglobulinelor și prin impactul asupra sintezei proteice, deoxinivalenolul are efect hematotoxic, imunomodulator sau de inducere a unei toxicități cutanate. La rumegatoare, deși efectele sunt mai puțin toxice, studiile au asociat deoxinivalenolul cu reducerea consumului de hrană (T r e h o l m, 1985) sau cu pierderea producției de lapte (W h i t l o w, 1991). Rezultate științifice recente au demonstrat că administrarea deoxinivalenolului, la oaie, produce modificări ale parametrilor sangvini și ale activității enzimelor hepatice (B u s u r i c u și Z a m f i e s c u, 2007).

Mecanismele de transfer al fusariotoxinelor în organismul animal și uman rămân însă încă neclare. H e d m a n (1997) consideră că ratele de absorbție și metabolizare diferite sunt datorate sensibilității diferite a animalelor. Alți specialiști (M e k y, 2003; C a v r e t, 2006) au considerat că fusariotoxinele sunt rapid absorbite în intestinul subțire și se elimină în primele 24 de ore de la ingestie, urmată de o excreție în cantități mici. Totuși, în produsele animaliere se găsesc urme ale fusariotoxinelor și a derivatelor lor. De aici apare nevoia unor studii avansate privind mecanismele implicate în metabolismul micotoxinelor și a neutralizării activității lor înainte de a evalua riscul asupra sănătății omului.

Deoarece cantitatea de deoxinivalenol prezentă în sângele și țesuturile de origine animală în urma intoxicației cu fusariotoxine este foarte mică, de ordinul ppm, se impune folosirea unor metode de analiză adecvată, cu limite de detecție în acest interval. Deși pentru analiza deoxinivalenolului se folosesc în general metode gaz cromatografice, și metoda cromatografiei de lichide de înaltă performanță (HPLC) oferă performanțe analitice similare, cu condiția unei purificări riguroase a probei.

Obiectivul acestui studiu a fost acela de a determina incidența contaminării cu deoxinivalenol a furajelor administrate animalelor din loturile experimentale ale laboratorului și determinarea gradului de transmitere a acestuia în sânge la ovine în condițiile unei intoxicații acute sau cronice.

MATERIALUL ȘI METODA DE CERCETARE

Metode de analiză

Experiențele s-au desfășurat la I.C.D.C.O.C. Palas-Constanța, în perioada 2007-2008, în baza unui proiect CEEEX, finanțat de la buget iar instituția conducătoare, care a și asigurat furajul contaminat, a fost I.N.C.D.A. Fundulea.

Furajul a fost contaminat artificial prin injectarea fânului de lucernă sub formă de baloți înfoliați cu filtratul de cultură al cipericii *Fusarium medicaginis* (un litru de filtrat/ balot de 20 kg), iar furajul de triticales a fost infestat artificial cu miceliu de *Fusarium graminearum* furnizat de Institutul de Cercetare-

Dezvoltare pentru Protecția Plantelor și Dezvoltare Rurală - București (izolatul a fost crescut pe mediu din semințe de triticale, în flacoane de 500 g).

Pentru realizarea intoxicației cronice, fiecare animal (n=30) a primit pe timpul iernii, zilnic, timp de 4 luni, 0,5 kg din amestecul măcinat de cereale și lucernă. În intoxicația acută, animalele (n=20) au primit 0,5 kg/zi, timp de 10 zile, amestec de cereale și lucernă contaminate cu o concentrație mai mare de ciuperci din genul *Fusarium*.

Determinarea deoxinivalenolului din furaje și ser s-a făcut prin metoda cromatografiei de lichide de înaltă performanță (HPLC) - detecție în UV (detector PDA), cu purificare pe coloana de imunoafinitate și prin tehnica ELISA. *Analizele cromatografice au fost efectuate la Universitatea Napoli, Dipartimento di Scienza degli Alimenti, laborator condus de prof. univ. dr. Alberto Ritieni, iar analizele de imunochimie s-au realizat în cadrul Laboratorului de Imunologie din I.C.D.C.O.C. Palas-Constanța.*

Probe de ser. Probele de ser au fost recoltate de la cele două loturi de câte 30, respectiv, 20 ovine din rasa Merinos de Palas, la terminarea perioadei de administrare a furajului contaminat, de 4 luni, respectiv, 10 zile. Lotul a fost constituit din animale apropiate ca vârstă și greutate corporală (42 ± 2 kg). De la fiecare animal au fost colectate probe de sânge integral. Ulterior sângele a fost incubat timp de două ore la 37°C și centrifugat timp de 10 min. la 3000 rpm pentru obținerea serului utilizat pentru determinarea micotoxinei.

Reactivi. Standardul de deoxinivalenol provine de la firma R-Biopharm Rhone LTD. Pudra a fost reconstituită într-o soluție de acetonitril care a fost conservată la -20°C până la prepararea standardelor de lucru. Solvenții folosiți pentru extracție și ca fază mobilă (apa distilată, metanol, acetonitril) au puritate grad HPLC. Enzima folosită în procesul de extracție a deoxinivalenolului din ser este β -glucuronidaza arilsulfataza extrasă din *Helix pomatia*.

Pentru determinarea micotoxinei din furaje și ser prin tehnica ELISA s-au folosit truse DON RIDASCREEN.

Metoda HPLC pentru determinarea deoxinivalenolului din concentratul de cereale

Extracția micotoxinei s-a efectuat prin omogenizarea a 25 g amestec contaminat măcinat în 200 ml apă distilată și agitare timp de 30 min. la temperatura camerei. Imediat după terminarea agitării, cel puțin 20 ml din extract s-a filtrat prin hârtie de filtru Whatman nr. 113.

Pentru **purificarea** probelor s-au folosit coloane de imunoafinitate DONPREP. S-a utilizat procesul de „backflushing” (inversarea fluxului eluanților pentru completa denaturare a anticorpilor) de 3 ori și apoi s-a trecut aer prin coloană.

Proba purificată, recuperată în metanol, a fost evaporată la sec sub un curent de azot. Ulterior aceasta a fost reluată în 1,0 ml fază mobilă și amestecată viguros timp de 30 sec. folosind un vortex. Această etapă are rolul atât de a concentra proba, ținând cont de cantitățile mici de analit, cât și pentru a obține rezultate reproductibile, prin reluarea într-un volum fix de fază mobilă. Din probă s-a injectat în sistemul HPLC un volum de 100 μ l.

Condiții cromatografice

Faza mobilă a fost constituită dintr-un amestec apă : metanol : acetonitril (94 : 3 : 3 v/v/v); eluția s-a realizat timp de 15 minute la un debit de 1,0 ml/min. la temperatura coloanei de 30°C.

Pregătirea standardelor și pregătirea curbei standard. Pudra cristalină de DON se reconstituie cu 10 ml acetonitril 100% pentru a obține o soluție stoc cu concentrația de 100 μg/ml DON. Din aceasta s-au preparat soluții seriate în faza mobilă (10 μg/ml, 5 μg/ml, 2 μg/ml, 1 μg/ml, 0,5 μg/ml) și s-a injectat 100 μl din fiecare soluție seriată de standard în sistemul HPLC.

Metoda HPLC pentru determinarea deoxinivalenolului din serul ovin

Extracția deoxinivalenolului din probele de ser s-a făcut după metoda descrisă de L a n g (2006). Probe de 2,0 ml de ser au fost incubate peste noapte, la temperatura camerei, cu câte 3,0 ml tampon fosfat (pH 6,8) și 80 μl β-glucuronidaza arilsulfataza extrasă din *Helix pomatia*. Cei 5,0 ml de ser, incubati, au fost purificați ulterior prin coloane de imunoafinitate DONPREP. Principiul de purificare este același ca pentru probele de cereale, diferă doar solvenții folosiți. Coloanele de imunoafinitate au fost spălate o dată cu 14,0 ml PBS și de două ori cu câte 2,0 ml apă distilată. Eluția s-a făcut cu 2,0 x 2,0 ml metanol. Probele obținute s-au concentrat la sec sub azot și au fost reconstituite în 150 μl faza mobilă (aceleași ca pentru probele de cereale), în vederea analizei HPLC. Condițiile cromatografice au rămas aceleași: s-a injectat câte 100 μl din fiecare probă; debitul a fost de 1,0 ml/min. Eluția s-a realizat timp de 15 minute, iar deoxinivalenolul a fost detectat la 218 nm.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

1. Intoxicația cronică

Rezultatele determinărilor concentrației de DON din probele de furaje.

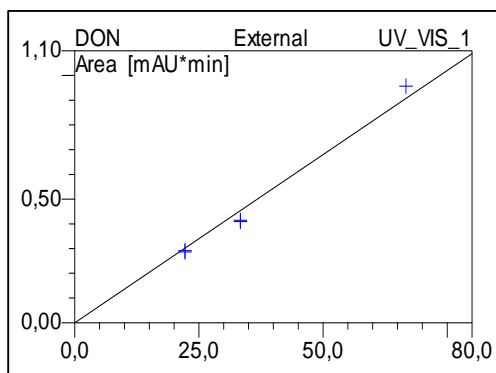
Analiza serului sangvin poate da informații prețioase privind expunerea la diferite concentrații de micotoxine. Probele biologice, de genul serului, sunt matrici complexe, în care un număr mare de produși pot interfera în analiza micotoxinelor și prezintă avantajul că pot fi colectate fără mari eforturi.

Metoda HPLC pentru determinarea micotoxinei DON din diferite matrice este o metodă cantitativă, de referință, care conferă o acuratețe sporită analizelor, însă necesită o purificare riguroasă a probelor. Purificarea se poate face prin mai multe metode, însă metoda cea mai folosită în prezent este purificarea prin coloane de imunoafinitate (IAC) (K r s k a și W e l z i g, 2001). Prin purificarea probelor cu ajutorul coloanelor de imunoafinitate se îmbunătățesc atât selectivitatea, cât și sensibilitatea metodei. Acest lucru permite o mai bună detecție a micotoxinei, chiar și atunci când aceasta se află în cantități foarte mici, de genul probelor de ser, și elimină interferențele legate de produșii acetilați ai deoxinivalenolului (3-AcDON și 15-Ac-DON).

Coloanele de imunoafinitate conțin un anticorp monoclonal specific pentru DON care poate purifica DON-ul din probe. DON-ul prezent în probă se leagă de anticorpul din coloană, care este apoi spălată pentru îndepărtarea interferențelor; toxina este eliberată ulterior prin eluare cu metanol.

Deși extracția din cereale sau alte produse derivate este mai eficientă în cazul folosirii unui amestec de apă și acetonitril (B e n n e t t și K l i c h, 2003; K r s k a și W e l z i g, 2001), în cazul nostru extracția deoxinivalenolului din probele de amestec de furaj s-a făcut numai în apă datorită purificării ulterioare a extractelor prin coloane de imunoafinitate. În cazul purificării prin coloane de imunoafinitate se pot folosi numai extracte obținute în apă, solvenții organici denaturând anticorpii.

Micotoxina DON a fost detectată la lungimea de undă de 218 nm, având timpul de retenție în condițiile date de ~7,5 min. Cuantificarea DON-ului s-a făcut prin compararea ariei picurilor probei cu cele ale standardelor, cu ajutorul softului de achiziție și prelucrarea datelor Chromeleon (Dionex). Curba de calibrare pentru detecția deoxinivalenolului din furaje (figura 1) este dreaptă și pornește din origine; coeficientul de linearitate obținut a fost de 0,996.



No.	Ret.Time min	Peak Name	Cal.Type	Points	Coeff.Det. %	Offset	Slope	Curve
1	1,43	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2	2,01	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
3	2,35	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4	2,92	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
5	3,19	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
6	3,84	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
7	7,39	DON	Lin	3	99,5894	0,0000	0,0104	0,0000
Average:					99,5894	0,0000	0,0104	0,0000

Fig. 1 – Curba de calibrare pentru deoxinivalenol
(Calibration curve of the deoxynivalenol)

Rezultatul analizelor probelor de furaje contaminate a evidențiat prezența micotoxinei DON (figura 2).

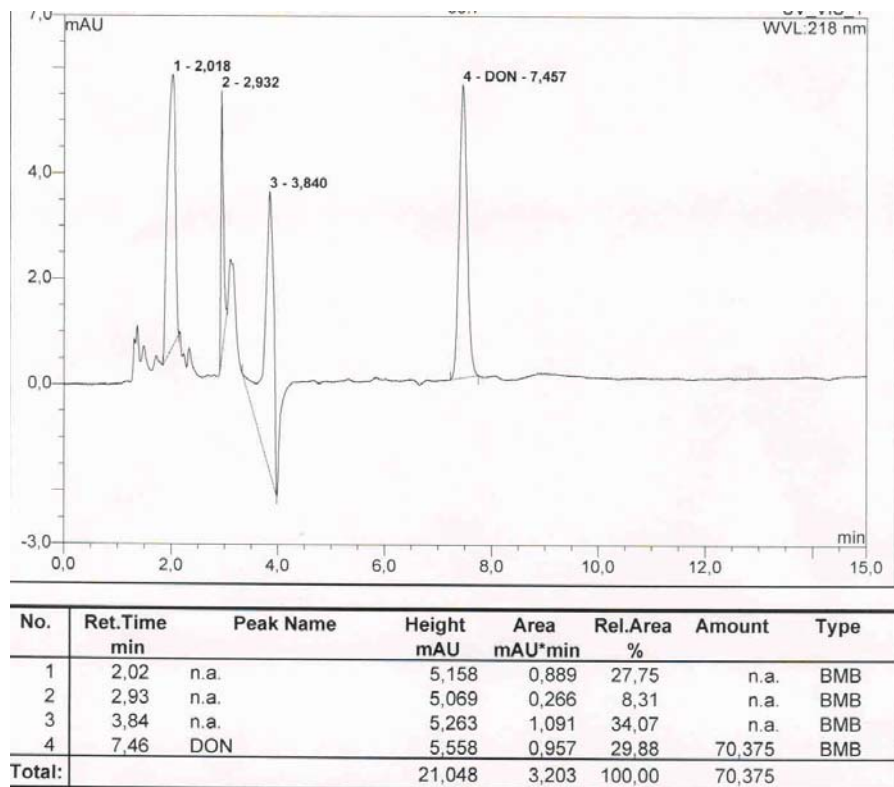


Fig. 2 – Cromatograma DON – furaj contaminat
(DON chromatogram – contaminated forage)

Concentrația medie înregistrată a fost de 41,54 micrograme/kg, cu variații cuprinse între 41,11 și 41,86 micrograme/kg (tabelul 1), în amestecul 1 (HPLC) și 3,45 mg, cu limite între 3,11-3,75 în amestecul 2 (ELISA); LD fiind de 18,5 mg.

Tabelul 1

Concentrație de DON înregistrată în probele de furaje
(DON concentration from the forage samples)

Nr. crt.	Concentrație DON	
	Amestec 1 (HPLC) µg/kg	Amestec 2 (ELISA) mg/kg
1	41,86	3,11
2	41,52	3,21
3	41,68	3,52
4	41,11	3,65
5	41,56	3,75
Medie	41,55	3,45

Probele de furaj administrate în cazul intoxicației acute au avut o concentrație medie de DON, analizată prin tehnica ELISA, de 3,45 mg/kg (tabelul 1).

Concentrația de DON nu depășește norma legală admisă (1250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pentru cereale neprocesate) stabilite de Comisia UE (Comisia Codex Alimentarius) (tabelul 2) pentru gradul de contaminare cu deoxinivalenol în cazul amestecului utilizat în inducerea intoxicației cronice, dar îl depășește în cazul furajelor administrate în intoxicația acută.

Tabelul 2

Limitele maxime stabilite de Uniunea Europeană privind concentrația DON din diferite matrice

(Maxim limits fixed by the European Union regarding DON concentrations in different matrices)

Produce	Nivel maxim ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Cereale neprocesate, altele decât grâu, ovăz și porumb	1250
Grâu, ovăz, porumb neprocesate	1750
Porumb neprocesat	1750
Făină de cereale incluzând și mălai	750
Pâine, biscuiți, cereale pentru mic dejun	500
Paste finoase	750
Cereale procesate pentru hrana sugarilor și copiilor mici	200

Rezultatele determinărilor concentrației de DON din probele de ser

Pentru extracția deoxinivalenolului din ser s-au incubat mai întâi probele cu enzima β -glucuronidaza arilsulfataza extrasă din *Helix pomatia*, deoarece la rumegătoare principalul metabolit în plasmă este conjugatul glucuronidat (P r e l u s k y și colab., 1986, 1987, 1997). Prezența metabolizilor glucuronidați a fost pusă în evidență prin creșterea ratei de recuperare a DON după tratamentul cu β -glucuronidaza arilsulfataza. Studiile au aratat că după administrarea orală a deoxinivalenolului proporția de DON glucuronid conjugat în plasmă este de 73% (P r e l u s k y și colab., 1986). Deși studiile arată că glucuronid DON este mai puțin toxic, timpul său de injumătățire este mai mare comparativ cu cel al DON-ului liber.

Analiza cromatografică a tuturor probelor de ser recoltate de la animalele supuse intoxicației cronice a condus la obținerea unor rezultate nesemnificative de intoxicare, la toate animalele din experiență, care ar putea fi explicate prin cantitatea mică ingerată, sub limita dozei zilnice tolerate (TDI); menționăm că pentru DON doza minimă este de 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ greutate corporală. Este important să luăm în calcul și faptul că rumegatoarele, comparativ cu animalele monogastrice, sunt mai rezistente la acțiunea majorității micotoxinelor, fapt datorat probabil, unei detoxificări la nivel ruminal.

În cazul animalelor intoxicate timp de 10 zile cu un furaj cu o concentrație crescută de DON, analiza serurilor recoltate la sfârșitul perioadei de contami-

nare a demonstrat trecerea deoxinivalenolului în sânge la un număr de 10 animale, într-o concentrație medie de 37,10 $\mu\text{g/l}$ (tabelul 3).

Tabelul 3

Concentrația de DON din ser (tehnica ELISA)
[DON concentration from serum (method ELISA)]

Nr. crt.	Concentrație DON $\mu\text{g/l}$
1	11
2	35
3	74
4	34
5	25
6	46
7	15
8	63
9	55
10	13
Medie	37,10

CONCLUZII

□ Gradul de contaminare cu deoxinivalenol a amestecului de furaj nu a fost foarte mare (41,54 $\mu\text{g/kg}$) în condițiile primului amestec testat.

□ Administrarea de durată (4 luni) a unei rații de 0,5 kg din acest amestec (cantitatea medie de DON ingerată a fost de 500 ng/kg greutate corporală) la ovine nu conduce la detectarea în ser a acestei micotoxine.

□ Absența deoxinivalenolului din probele de ser semnifică faptul că la această concentrație, acesta este fie eliminat rapid, fie transformat în alți produși de metabolism.

□ Administrarea unui furaj cu o cantitate de DON crescută (3,45 mg/kg) a condus la trecerea acestuia în sânge în proporție de 50%, prezența micotoxinei în ser având valoarea medie de 37,1 $\mu\text{g/l}$.

□ La rumegătoare s-au realizat mai puține studii cu privire la efectul tricotecenelor, iar rezultatele sunt destul de contradictorii. Ca urmare, studiile ulterioare trebuie să determine dacă la alte concentrații de DON are loc transmiterea acestuia în ser.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- BENNETT, J.W, KLICH, M., 2003 – *Mycotoxins*. Clinical Microbiology Reviews, vol. 16.
- BUSURICU, F., ZAMFIRESCU, S., 2007 – *The preliminary study of the toxicity with Fusarium sp. mycotoxins at goats*. The Annual International Conference of the SRBBM, Timișoara, 6-8.09.2007.
- CAVRET, S., LECOEUR, S., 2006 – *Fusariotoxin transfer in animal*. Food and Chemical Toxicology, 44 444-453.

- HEDMAN, R., PERTTERSON, H., LINDBERG, J., 1997 – *Absorption and metabolism of nivalenol in pig*. Arch Tierernähr., 50: 13-24.
- LANG, CH., STUMPF, I., SETYABUDI, F., SIPOS, W.I, RAZZAZIFAZELI, E., BÖHM, J., BINDER, E.M., SCHMOLL, F., 2006 – *Concentrations of Deoxynivalenol (DON) in Serum of Pigs after Feeding with Deoxynivalenol-Contaminated Feeding Stuff* – Method Development and Kinetic Study. Poster presented at the BIOMIN World Nutrition Forum., 2006.
- KRSKA, R., WELZIG, E., 2001 – *Analysis of Fusarium toxins in feed*. Animal Feed Science and Technology, 137: 241-264.
- MEKY, F.A., TURNER, P.C., ASHCROFT, A.E., 2003 – *Development of a urinary biomarker of human exposure to deoxynivalenol*. Food Chem. Toxicol., 41: 265-273.
- PRELUSKY, D.B., VEIRA, D.M., TRENHOLM, H.L. & HARTIN, K.E., 1986 – *Excretion profiles of the mycotoxin deoxynivalenol following oral and intravenous administration to sheep*. Fundam. Appl. Toxicol., 6: 356-363.
- PRELUSKY, D.B., VEIRA, D.M., TRENHOLM, H.L. & FOSTER, B.C., 1987 – *Metabolic fate and elimination in milk, urine and bile of deoxynivalenol following administration to lactating sheep*. J. Environ. Sci. Health B, 22: 125-148.
- PRELUSKY, D.B., ROTTER, B.A., THOMPSON, B.K. & TRENHOLM, H.L., 1997 – *Effect of the appetite stimulant cyproheptadine on deoxynivalenol-induced reductions in feed consumption and weight gain in the mouse*. J. Environ. Sci. Health B, 32: 429-448
- RĂDUCANU, FLORENTINA, ZAMFIRESCU, STELA, 2008 – *Implicațiile micotoxinelor în lanțul trofic plante furajere-animale-om*. Editura EX PONTO, ISBN :978-973-644-786-0.
- TRENHOLM, H.L., THOMPSON, B.K., HARTIN, K.E., GREENHALGH, R., MC ALLISTER, A.J, 1985 – *Ingestion of vomitoxin (deoxynivalenol)-contaminated wheat by non lactating cows*. J. Dairy. Sci., 68: 1000-1005.
- WHITLOW, L.W., NEBEL R. L. AND. HAGLER JR., W.M., 1991 – *The association of deoxynivalenol in grain with milk production loss in dairy cows*. Biodeterioration research 4. Plenum Press, New York: 131.
- ***COMMISSION REGULATION (EC) No 856/2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards Fusarium toxins.