

Wpływ niskich dawek deoxynivalenolu podawanych per os na poziom tej mikotoksyny w surowicy krwi świń^{*})

ŁUKASZ ZIELONKA, MACIEJ GAJĘCKI, KAZIMIERZ OBREMSKI,
WOJCIECH ZWIERZCHOWSKI

Katedra Profilaktyki Weterynaryjnej i Higieny Pasz Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM,
ul. Oczipowskiego 13, 10-057 Olsztyn

Zielonka Ł., Gajęcki M., Obremski K., Zwierzchowski W.

Influence of low doses of deoxynivalenole on the level of this micotoxin in pig serum

Summary

The signs that occur in pigs during deoxynivalenole (DON) intoxications are strongly expressed in the form of vomiting and dysenteric diarrhoea, which in many cases leads to death. However, the subclinical form of deoxynivalenole micotoxicosis is the most frequent one and it is also very difficult to diagnose even for experienced clinicians. Laboratory determination of the presence of this xenobiotic in animal blood seems to be the ideal solution for the problem, but determination of the level of this intoxication and its influence on the animal body still causes a great deal of difficulties. The aim of the study was to determine the level of deoxynivalenole in pig plasma after intoxication of low doses (0.2 and 0.4 mg/kg b.w.) of this xenobiotic. Basing on the obtained results it was stated that the level of micotoxin determined in blood plasma goes down sinusoidally along with decreasing amplitude. The highest concentrations were stated in both experimental groups in the third hour after the toxin had been applied. The level of DON in blood plasma decreases with time. The decrease is faster in the group where the dose was 0.2 mg/kg b.w. In the sixth hour after application the DON concentration did not go below 2.63 ng/ml. A high level of 5.30 ng/ml was sustained till the ninth hour in the group where a doubled dose of DON was applied. Low levels of deoxynivalenole in the samples taken 18 h after intoxication indicate how important it might be to establish a proper time of sample taking. It is also indicative of the great effort of the body in eliminating the xenobiotic.

Keywords: pig, deoxynivalenole, blood plasma

Deoxynivalenol (DON) po raz pierwszy oznaczono w 1973 r. w Stanach Zjednoczonych w porażonym przez *Fusarium graminearum* ziarnie kukurydzy (25). Nieco wcześniej w Japonii wyizolowano związek nazwany vomitoksyną (17, 18). Późniejsze badania potwierdziły identyczną strukturę chemiczną obu tych związków. Intoksykacjom DON u świń towarzyszyły objawy w postaci wymiotów i krwawych biegunek, równocześnie miały miejsce liczne padnięcia zwierząt (20). W chwili obecnej do intoksykacji o podobnym nasileniu objawów chorobowych dochodzi niezmiernie rzadko. Znacznie częściej występują subkliniczne postaci mikotoksykozy, bardzo trudnej do zdiagnozowania, nawet dla doświadczonych klinicystów (7, 16). Z reguły u świń ma miejsce zmniejszony apetyt i rozluźnienie mas kałowych, czyli objawy mało charakterystyczne.

Problemem jest również częste mylne diagnozowanie zatruc metabolitami pleśniowych grzybów toksynotwórczych (4) z zakażeniami bakteryjnymi (9), wirusowymi (13-15) czy obecnością substancji niepożądanych w środkach żywienia zwierząt (4, 8, 10, 19, 24, 26). Do schorzeń z podobnymi objawami klinicznymi należą między innymi np.: dyzenteria, choroba Aujeszky'ego i zatrucie solą. Zdarza się też, że lekarz weterynarii nie jest w stanie pobrać próbek paszy do badań laboratoryjnych, ponieważ dana partia paszy, o prawdopodobnie złej jakości zdrowotnej z racji obecności mikotoksyny, została skarmiona i zastąpiona nową. Efektem tego uzyskany wynik badania paszy może być fałszywie ujemny (4). Jest to wynik „punktowego”

wzrostu pleśni w całej masie magazynowanego materiału paszowego lub samej paszy. Dodatkowym źródłem, oprócz świeżo podanej paszy, mogą być jej resztki zalegające w karmidlach.

Dlatego też idealnym wyjściem z sytuacji wydaje się możliwość wykonania oznaczeń laboratoryjnych na obecność mikotoksyny w wybranych tkankach zwierząt z nietypowymi objawami klinicznymi (4). Na konieczność takich badań wskazują zarówno polscy badacze (5, 8), jak i naukowcy pracujący na rzecz organizacji międzynarodowych (12). Chociaż oznaczanie mikotoksyny w surowicy krwi zwierząt jest najlepszym dowodem intoksykacji tych zwierząt, to określenie jej poziomu i jej wpływu na organizm zwierzęcia (a w dalszej perspektywie może i człowieka) wciąż sprawia wiele trudności.

Celem badań było określenie poziomu deoxynivalenolu w surowicy krwi świń po intoksykacji niskimi dawkami tej mikotoksyny.

Materiał i metody

Czynności związane z wykonywaniem doświadczeń na zwierzętach przeprowadzono z zachowaniem obowiązujących w Polsce norm prawnych, które określają warunki i sposoby dokonywania eksperymentów na zwierzętach (opinia Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie z dnia 19.06.2001 r. nr 18/N).

Doświadczenia przeprowadzono na 12 warchlakach mieszańcach (wielka biała polska × polska biała zwisłoucha) o średniej masie ciała $35 \pm 2,4$ kg, pochodzących z Fermy Przemysłowego Tuczny Trzody Chlewnej Inter-Food Sp. z o.o. w Wągródce. Stan

^{*} Pracę wykonano w ramach projektu badawczego KBN 5 PO6K 017 18.

utrzymania i odżywienia warchlaków był dobry. W czasie trwania eksperymentu zwierzęta przebywały w indywidualnych klatkach.

Warchlaki były karmione *ad libitum* mieszanką przemysłową (CentralSoya.). Miały zapewniony stały dostęp do wody. Pasza nie zawierała deoxynivalenolu i innych mikotoksyn, takich jak: aflatoksyna, ochratoksyna A czy zearalenol, co zostało ocenione metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Warchlaki doświadczalne podzielono na 3 grupy: grupa I (n = 4) – kontrolna; grupa II (n = 4) – gdzie podawano DON w dawce 0,2 mg/kg m.c. (dawka – NOAEL – no observed adverse effect level); grupa III (n = 4) – gdzie podawano DON w dawce 0,4 mg/kg m.c. (dawka – LOAEL – lowest observable adverse effect level).

Po 5-dniowej adaptacji warchlakom wprowadzano chirurgicznie poliwinylowe kaniule (średnica wewnętrzna 1,2 mm, średnica zewnętrzna 1,6 mm) do żyły szyjnej zewnętrznej wg metody opisanej przez Kotwicę (11).

W celu premedykacji zwierzętom podawano domięśniowo siarczan atropiny (Atropina; Polfa, Warszawa) w dawce 0,04 mg/kg m.c. i propriopromazyne (Combelen; Biovet, Puławy) w dawce 0,2 mg/kg m.c. Znieczulenie ogólne wywoływano dożylnym (żyła brzeżna ucha) podaniem soli sodowej pentobarbitalu (Vetbutal; Biovet, Puławy) w dawce 10 mg/kg m.c. Po zabiegu podawano domięśniowo amoksycylinę (Betamox® L.A., SCANVET) w dawce 1 ml/10 kg m.c.

Krew pobierano z żyły szyjnej zewnętrznej przez wprowadzone uprzednio kaniule. Po każdorazowym pobraniu ubytek krwi uzupełniano podobną ilością płynu Solfin® (Polfa; Kutno). W celu przeciwdziałania powstania zakrzepom krwi kaniule wypełniano 3 ml Solfinu z heparyną (Heparyn Biochemie GmbH, Kunal-Austria) w koncentracji 25 000 j.m./litr Solfinu.

Krew do badań pierwszy raz pobrano w czwartym dniu po wykonaniu zabiegu kaniulizacji. Kolejne pobrania dokonywano w następujących terminach: 1., 3., 6., 9., 12., 18., 24., 30., 42., 54. i 66. godzinie po podaniu toksyny. Krew pobierano do próbek wirówkowych pozbawionych antykoagulantu i następnie wirowano przez 20 min. przy 3000 obr./min. w temp. 4°C. Uzyskaną surowicę krwi po przeniesieniu do plastikowych próbek o pojemności 3 ml, zamrażano i przechowywano w temperaturze –20°C. W tak przygotowanych próbkach oznaczano poziom deoxynivalenolu.

Przygotowanie skażonej DON paszy wykonano, rozpuszczając w 150 µl 96% alkoholu etylowego (SWW 2442-90. Polskie Odczynniki Chemiczne S.A.) 5 mg mikotoksyny (Deoxynivalenol Sigma Chemical CO. Steinheim, Niemcy). Uzyskany roztwór наносono na paszę umieszczoną w żelatynowych kapsułkach i pozostawiano na 12 godz. w temperaturze pokojowej w celu odparowania rozpuszczalnika. Paszę skażoną DON podano jednorazowo, w czwartym dniu po kaniulizacji, podczas porannego odpasu, po wcześniejszej 12-godzinnej głodówce, tj. w pierwszym dniu doświadczenia, w formie przygotowanych wcześniej kapsulek.

Oznaczanie DON i jego metabolitów w surowicy krwi przeprowadzono, stosując łącznie technikę separacji z kolumnkami powinowactwa immunologicznego (DON-Test™ Deoxynivalenol Testing System, VICAM, Watertown, USA) i wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) z detekcją UV. Surowicę rozmrażano w łaźni wodnej (łaźnia wodna typ LW-1) o temperaturze 37°C. W celu usunięcia zanieczyszczeń podłoże kolumnki przemywano wodą dejonizowaną (Milipore Water Purification System, Millipore S.A. Molsheim-France). Uzyskaną surowicę w sposób bezpośredni przepuszczano przez kolumnę immunofinitywną Don-Test firmy VICAM, a następnie mikotoksyny związane z podłożem eluowano 99,8% metanolem. Uzyskany eluat umieszczano w łaźni wodnej o temperaturze 50°C i w całości odparowywano w strumieniu azotu. Osad zawieszano w 0,25 ml fazy ruchomej. Analizę obecności badanej mikotoksyny wykonywano wykorzystując: kolumnę chromatograficzną – ODS Hypersil 5 µm 4 × 250 mm No. 799260D-584, Agilent, USA; prekolumnę – RP-18; objętość nasyty – 100 µl; fazę ruchomą – acetonitryl (8%) (LiChrosolv™, No. 984730 109, Merck-Hitachi, Niemcy), metanol (10%) (LiChrosolv™, No. 1.06007, Merck-Hitachi, Niemcy), woda dejonizowana (82%) (Milipore Water Purification System, Millipore S.A. Molsheim-France); szybkość przepływu – 1,5 ml/min; detektor – Detektor UV Hewlett Packard 1050; długość fali – λ = 242 nm; temperaturę pieca kolumny – 30°C; czas analizy chromatograficznej – 8 min.

Dane rejestrowano i integrowano, wykorzystując integrator komputerowy POL-LAB i program komputerowy do obróbki danych chromatograficznych CHROMAX for Windows ver. 2000 (Pol-Lab Artur Dzieniszewski). Stężenia mikotoksyn obliczano metodą standardu zewnętrznego; wartości podano w ng/ml.

W celu sprawdzenia stopnia odzysku wolne od deoxynivalenolu surowice fortyfikowano różnymi ilościami deoxynivalenolu: 40 ng/ml (n = 5), 20 ng/ml (n = 5), 10 ng/ml (n = 5) 5 ng/ml (n = 5). Sposób wykonania procesu analiz był zgodny z przyjętą wcześniej metodyką oznaczania. Stopień odzysku wyniósł 62% ± 1,8. Uzyskane wyniki badań poziomu deoxynivalenolu zostały skorygowane o wartość stopnia odzysku.

Otrzymane wyniki przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej (\bar{x}) i błędu standardowego średniej (SEM). W celu statystycznej weryfikacji rezultatów zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA). W wypadku odrzucenia hipotezy zerowej różnice zweryfikowano testem Duncana (alfa = 0,01). W celu uściślenia wyników, wykorzystano analizę regresji wielokrotnej oraz zastosowano macierze korelacji. Powyższe analizy wykonano, stosując program komputerowy STATISTICA®.

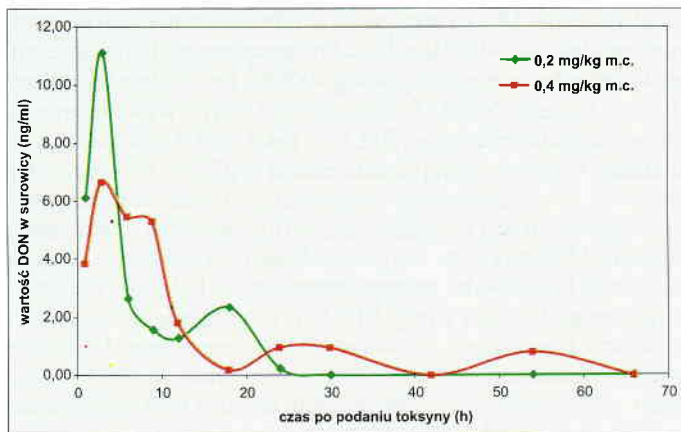
Wyniki i omówienie

W wartościach uzyskanych wyników (tab. 1) uwagę zwraca fakt, że poziom mikotoksyny oznaczany w surowicy krwi nie spadał w sposób nieprzerwany i stopniowy aż do poziomu zerowego, jak to zaobserwowano w badaniach po podaniu dożylnym DON-u w wysokiej dawce (22). Linia obrazująca poziom deoxynivalenolu przypomina raczej

Tab. 1. Stężenie DON (ng/ml) w surowicy krwi warchlaków po jednorazowym podaniu DON (n = 4; $\bar{x} \pm$ SEM)

Grupa zwierząt	Czas (h) po podaniu DON											
	0	1	3	6	9	12	18	24	30	42	54	66
Grupa II	0,00	6,11	11,11**	2,63	1,57	1,27	2,33	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00	2,43	7,57	0,12	0,95	1,27	0,79	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00
Grupa III	0,00	3,86	6,67**	5,47	5,30	1,82*	0,19	0,96	0,95	0,00	0,80	0,00
	0,00	1,34	2,11	2,38	1,57	0,95	0,20	0,96	0,58	0,00	0,35	0,00

Objaśnienia: *istotne przy alfa = 0,05 w stosunku do „0”, **istotne przy alfa = 0,01 w stosunku do „0”



Ryc. 1. Poziom stężenia deoksynivalenolu w surowicy krwi świń z grupy II i III

sinusoidę o zmniejszającej się amplitudzie (ryc. 1), co sugeruje, że po podaniu doustnym DON nie jest w całości metabolizowany. Można przypuszczać, że wątroba nie jest w stanie poradzić sobie z całą dawką ksenobiotyku, dlatego prawdopodobnie jego dystrybucja przebiega w kilku kierunkach (1).

Najwyższe wartości stężenia deoksynivalenolu w surowicy krwi stwierdzono, w obu grupach doświadczalnych w 3. godzinie po podaniu toksyny. Wraz z upływem czasu, poziom DON-u w surowicy krwi spada. Następuje to jednak znacznie szybciej w grupie II (o niższym stężeniu DON-u w dawce). W tej grupie, już w 6. godzinie po podaniu, stężenie DON-u nie spada poniżej 2,63 ng/ml (tab. 1).

W grupie III (dwukrotnie wyższe stężenie DON-u w dawce), poziom ten utrzymywał się dłużej, bo do 9. godziny, na względnie wysokim poziomie wynoszącym 5,30 ng/ml (tab. 1). Była to wartość, dwukrotnie wyższa w porównaniu z grupą II.

Badania przeprowadzone z innymi mikotoksynami z grupy trichotecen lub innymi ksenobiotykami pozwalają przypuszczać, że następuje wiązanie deoksynivalenolu z bilirubiną i magazynowanie tak powstałego kompleksu w żółci (2, 4, 23). W związku z tym, że wydzielanie żółci do światła przewodu pokarmowego u świń jest ściśle związane z nasileniem się procesów trawiennych, można przypuszczać, że zauważony kilkakrotny wzrost poziomu deoksynivalenolu w surowicy krwi jest związany z jego wchłanianiem się w jelitach cienkich z wydzielanej do światła żółci. Mechanizm taki zaobserwowano w badaniach nad metabolizmem innych mikotoksyn (1).

Na uwagę zasługuje również fakt, że po zastosowaniu większej dawki DON-u (0,4 mg/kg m.c.) stężenie tego ksenobiotyku w surowicy krwi utrzymuje się na poziomie pozwalającym na jego oznaczenie, przy zastosowanej metodzie do 54 godzin po podaniu, podczas gdy po zastosowaniu niższej dawki (0,2 mg/kg m.c.) poziom ten utrzymuje się do 24 godzin po podaniu (ryc. 1). Jest to zgodne z badaniami innych autorów (6), którzy stwierdzali ponadto znacznie dłuższą obecność deoksynivalenolu w wątrobie i nerkach, głównych narządów odpowiedzialnych za wydalanie tej mikotoksyny z organizmu (3, 17, 21).

Oznaczano również niewielkie ilości deoksynivalenolu w tkance mózgowej i w tkance tłuszczowej (22). Prelusky (22) w badaniach deoksynivalenolu znakowanym izotopem ^{14}C stwierdził, że u świń mniej niż 5% tej mikotoksyny jest usuwane w postaci trwałego połączenia z innymi związka-

mi, zupełnie inaczej niż u przeżuwaczy, u których 25-45% deoksynivalenolu jest wydalane w połączeniach z β -glukuronidazą. Oznaczane poziomy deoksynivalenolu w surowicy krwi w 1. godzinie po podaniu potwierdzają hipotezę o bardzo szybkim jego wchłanianiu w jelitach cienkich. Minimalny czas oznaczony w badaniach deoksynivalenolu znakowanego izotopem ^{14}C , wynosił około 18 minut (22). Niskie poziomy deoksynivalenolu w próbkach pobranych w 18 godzin po intoksykacji obrazują, jak ważne może się okazać właściwe dobranie momentu pobrania próbki do badania i równocześnie – mobilizację organizmu do wydalania ksenobiotyku poza organizm żywy.

Uzyskane wyniki badań mogą sugerować, że zasadne jest pobieranie próbek krwi w celu określenia obecności deoksynivalenolu są w pierwszych godzinach po wystąpieniu objawów zmniejszonego apetytu wraz z towarzyszącymi objawami biegunki z nieznaczną domieszką krwi. Należy jednak pamiętać, że nie są to objawy patognomiczne.

Piśmiennictwo

- Biehl M. L., Prelusky D. B., Koritz G. D., Hartin K. E., Buck W. B., Trenholm H. L.: Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1993, 121, 152-159.
- Bull L. D., Lockheart M. J., Elhmmali M. M., Roberts D. J., Evershed R. P.: The origin of faeces by means of biomarker detection. *Environ. Int.* 2002, 27, 647-654.
- Coppock R. W., Swanson S. P., Gelberg H. B., Koritz G. D., Hoffman W. E., Buck W. B., Vesonder B. S.: Preliminary study of the pharmacokinetic and toxicopathy of deoxynivalenol in swine. *Am. J. Vet. Res.* 1985, 46, 169-174.
- Čonková E., Laciaková A., Kováč G., Seidel H.: Fusarial toxins and their role in animal diseases. *Vet. Journ.* 2003, 165, 214-220.
- Czerwiecki L.: Krytyczna ocena metod oznaczania mikotoksyn. Konferencja naukowa pt. Mikotoksyny: klasyfikacja, problemy analityczne i zdrowotne. Warszawa 25 września 1995, s. 18-24.
- Eriksen G. S., Alexander J.: Fusarium toxin in cereals – a risk assessment. Nordic Council of Ministers. Tema Nord. 1998, 502, 7-27.
- Gajecki M.: Bezpieczne środki żywienia zwierząt do bezpieczna żywność pochodzenia zwierzęcego. *Życie Wet.* 2000, 75, 514-517.
- Gajecki M.: Zearalenone – undesirable substances in feed. *Polish J. Vet. Sci.* 2002, 5 (2), 117-122.
- Gliński Z., Kostro K., Swoboda-Mazurek M.: Zoonozy XXI wieku. *Medycyna Wet.* 2002, 8 (1), 18-22.
- Kennedy D. G., Cannavan A., McCracken R. J.: Regulatory problems caused by contamination, frequently overlooked cause of veterinary drug residues. *J. Chromatogr. A* 2000, 882, 37-52.
- Kotwica J., Krzymowski T., Dębek J.: Kaniulowanie naczyń żylnych świń do badań endokrynologicznych. *Medycyna Wet.* 1978, 34, 118-120.
- Kouba M.: Quality of organic animal products. *Livest. Prod. Sci.* 2003, 80, 33-40.
- Larski Z.: Niektóre nowe dane dotyczące wirusologii. *Medycyna Wet.* 2000, 56 (1), 5-10.
- Larski Z.: Niektóre nowe dane dotyczące wirusologii i zakaźnych gąbczastych encefalopatii. *Medycyna Wet.* 2002, 58 (1), 13-17.
- Larski Z.: Niektóre nowe dane dotyczące wirusologii i zakaźnych gąbczastych encefalopatii. *Medycyna Wet.* 2003, 59 (2), 95-99.
- McEvoy J. D. G.: Contamination of animal feedstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. *Anal. Chim. Acta* 2002, 473, 3-26.
- Moon Y., Pestka J. J.: Cyclooxygenase-2 mediates interleukin-6 upregulation by vomitoxin (deoxynivalenol) in vitro and in vivo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003, 187, 80-88.
- Morooka N., Uratsuki N., Yoshizawa T., Yamamoto H.: Studies on the toxic substances in barley infected with *Fusarium* spp. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 1972, 13, 368-375.
- Obremski K.: Próba doświadczalnego ustalenia wartości diagnostycznych poziomów zearalenonu i jego metabolitów we krwi loszek. Praca doktorska. Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie 2001.
- Placinta C. M., D'Mello J. P. F., Macdonald A. M. C.: A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1999, 78, 21-37.
- Prelusky D. B., Hartin K. E., Trenholm H. L., Miller J. D.: Pharmacokinetic fate of ^{14}C -labelled deoxynivalenol in swine. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1988, 10, 276-286.
- Prelusky D. B., Trenholm H. L.: Tissue distribution of deoxynivalenol in swine dosed intravenously. *J. Agric. Food Chem.* 1991, 39, 748-751.
- Rhind S. M.: Endocrine disrupting compounds and farm animals: their properties, actions and routes of exposure. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2002, 23, 179-187.
- Sharma M., Márquez C.: Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2001, 93 (1-2), 109-114.
- Vesonder R. F., Ciegler A., Jensen A. H.: Isolation of the emetic principle from *Fusarium*-infected corn. *Appl. Microbiol.* 1973, 25, 1008-1010.
- Zwierzchowski W.: Wpływ niskiej dawki zearalenonu na układ rozrodczy niedojrzałych płciowo loszek. Praca doktorska. Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie 2002.

Adres autora: Łukasz Zielonka, ul. Oczapowskiego 13, 10-057 Olsztyn