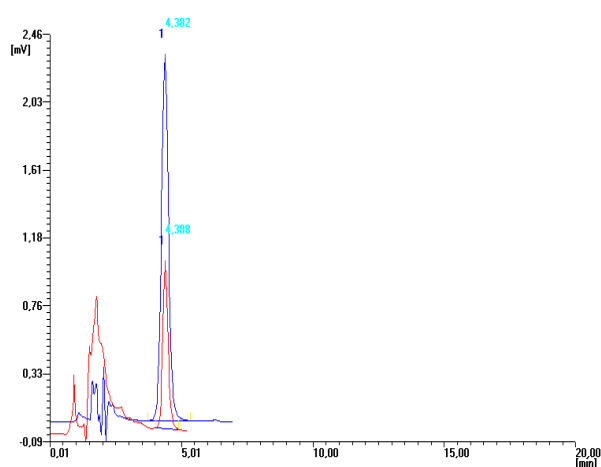


Zasady pobierania prób i interpretacji wyników badań laboratoryjnych

Mikotoksyny – interpretacja wyników badań

Znanych jest ponad 400 mikotoksyn. Z tego ledwie kilka jest uważanych za podstawowe w toksykologii weterynaryjnej (aflatoksyny, trichoteceny, zearalenony, fumonizyny, ochratoksyny). Nie oznacza to jednak iż pasze w których nie stwierdzono najczęściej spotykanych mikotoksyn nie zawierają ich w ogóle. Istnieje szereg mikotoksyn, które są bardziej toksyczne ale występują rzadziej (tu ważny region świata z którego pochodzi surowiec) i w badaniach rutynowych nie są diagnozowane (np. NIV, T-2, HT-2). Nadto należy pamiętać, iż poziom mikotoksyn nie jest stały !!! Ich poziom często spada nawet do wartości niewykrywalnych po czym narasta (oscylacja). Nie znamy również toksyczności związków powstałych wskutek naturalnej degradacji mikotoksyn. W badaniach nad mikotoksynami istotna jest też wiedza o ich punktowym występowaniu (uszkodzone ziarno, wilgotność). Sposób pobrania próbek jest zatem bardzo istotnym elementem badania (próbka zbiorcza nie mniejsza niż 2 kg i pobrana z co najmniej kilkunastu miejsc). Ważne jest też zabezpieczenie próbki podczas transportu i przechowywania. Niektóre mikotoksyny łatwo jest oznaczać bezpośrednio we krwi zwierząt (ochratoksyny, zearalenon) unika się wówczas błędów pobrania próbek.



Ryc. 1 przykład chromatogramu w analizie mikotoksyn w technice HPLC

Interpretacja wyników badań pod kątem mikotoksykologicznym jest szczególnie trudna. Wynika to z różnorodności wniosków otrzymywanych w badaniach naukowych. Od skrajnie liberalnych, których wyrazem są unijne regulacje dotyczące np. deoksynivalenolu (DON) czy fumonizyn po bardzo restrykcyjne (aflatoksyny), których zwolennicy przekonują o szkodliwości nawet niewielkich zawartości mikotoksyn w paszach.

Badania naukowe prowadzone są tu dwutorowo: jedne opierają się na analizie przypadków klinicznych a inne na ich wywoływaniu podawaniem wybranych

dawek określonej (najczęściej syntetycznej) mikotoksyny. Każda z tych metod obarczona jest błędem. Podczas analizy przypadków klinicznych w zasadzie nie dysponujemy grupami kontrolnymi, praca ogranicza się do stwierdzenia obecności wybranej mikotoksyny bez całościowej analizy innych czynników mogących powodować zbliżone objawy. Efektem są „wnioski” sugerujące, że np. DON na poziomie 60 ppb wywołuje wymioty a na poziomie 300 ppb ciężką dysfunkcję przewodu pokarmowego (lub odwrotnie!). Z drugiej strony nie trudno znaleźć prace w których dawki syntetycznego DON na poziomie 10 ppm nie wywołują szczególnie groźnych konsekwencji. Czytelnik nie znający chemii (chiralności związków syntetycznych) przyjmie zatem, że szkodliwość mikotoksyn jest niewielka.

Wskutek braku środków badania prowadzone są na bardzo ograniczonym materiale w warunkach „sanatoryjnych”, często całe doświadczenie trwa tylko kilka dni, zwykle nie uwzględnia się schorzeń towarzyszących, warunków zoohigienicznych etc.

Powyższe wskazuje jak trudne jest właściwe podejście do problemów interpretacyjnych. Aby przybliżyć nieco zagadnienie kilka słów o toksykologii mikotoksyn:

Działanie mikotoksyn można skatalogować na szereg sposobów, przytaczam najprostszy:

- ostre zatrucia – w mniemaniu wielu i hodowców i lekarzy ta forma jest dominująca. Tymczasem ostatnia wielka mikotoksykoza miała miejsce na Ukrainie w latach 20-tych XX- wieku. Ta forma zdarza się okazjonalnie przy stosowaniu silnie zagrzybionych surowców paszowych. Częściej w gospodarstwach małych nie posiadających suszarni. Częstsze również w klimacie tropikalnym. Towarzyszą objawy typowe dla zatruc typu ostrego.
- mikotoksykozy podostre i przewlekłe - znacznie częstsze niż zatrucia ostre. Zaznaczone objawy kliniczne oraz anatomopatologiczne (mało specyficzne, niekiedy ze wskazaniem np. ogniska martwicze przy ochratoksynie, proliferacja przewodów żółciowych przy aflatoksynach, wymioty, biegunki – przy deoksynivalenolu, problemy z rozrodem – przy zearalenonie). W zatruciach przewlekłych obja-

wy bezpośrednio są znikome lub ich brak. W tych przypadkach najczęściej dochodzi do osłabienia organizmu (zwłaszcza immunosupresja) i zakażeń oportunistycznych. Często dopiero analiza ekonomiczna wskazuje na słabe przyrosty, gorsze wykorzystanie paszy. Rzadko prawidłowo diagnozowany jest pierwotny czynnik etiologiczny.

- działanie kumulatywne. Mikotoksyny jako naturalne ksenobiotyki, nie kumulują się w tkankach (organizmy wytworzyły formy ich dezaktywacji), natomiast kumuluje się ich działanie. Efekt ten obserwowany jest przy każdej mikotoksynie. Np. aflatoksyny łączą się z DNA blokując miejsca transkrypcji. Im więcej zablokowanych miejsc tym wyraźniejsze reakcje organizmu (zwykle nowotwory). Także stopniowa destrukcja (zwłaszcza komórek układu nerwowego, wydalniczego czy krwiotwórczego) komórek powoduje nieodwracalne zmiany.
- działanie immunosupresyjne - obserwowane przy wielu mikotoksynach. Układ immunologiczny jest niewydolny, wskutek czego dochodzi do szybszego rozwoju zakażeń i cięższych przebiegów chorób. Działanie synergistyczne z innymi czynnikami etiologicznymi w tym wirusami czy bakteriami..
- działanie teratogenne i kancerogenne - obserwowane przy długotrwałym podawaniu pasz skażonych nawet niewielkimi ilościami mikotoksyn (fumonizyny, aflatoksyny). Nie obserwowane u zwierząt typu brojler.
- działanie mutagenne - szereg mikotoksyn ma wpływ na tworzenie nieprawidłowych podziałów redukcyjnych jak również na stan samego łańcucha DNA.

Najczęstszą formą negatywnego wpływu mikotoksyn na produkcję zwierzęcą jest immunosupresja oraz wywołanie podklinicznych stanów nieżytych przewodu pokarmowego (często w synergistycznym działaniu z wirusami, bakteriami, innymi mikotoksynami itp.), co w fazie początkowej przejawiać się może przejściowym zwiększonym zużyciem paszy na kg/przyrostu, a przy dłuższym oddziaływaniu uporczywe rozluźnienia kału a nawet biegunki (w tym krwawe), trudno poddające się terapii. Następstwem są zwykle zakażenia oportunistyczne, charłaczenia i brakowania.

Stosunkowo wcześniej uregulowano dopuszczalne normy stężenia aflatoksyn:

Pasze i surowce: Zgodnie z PN-R-64757/94 dopuszczalna zawartość AFT w paszach wynosi 5-50 ppb (w zależności od przeznaczenia).

- | | |
|---|----------|
| ❖ pasze pełnoporcjowe dla bydła, owiec i kóz | - 50 ppb |
| ❖ pasze pełnoporcjowe dla trzody chlewnej i drobiu | - 20 ppb |
| ❖ pasze pełnoporcjowe dla zwierząt w okresie laktacji | - 5 ppb |
| ❖ pasze pełnoporcjowe dla cieląt, jagniąt, kozłat i kurcząt | - 10 ppb |
| ❖ inne pasze pełnoporcjowe | - 10 ppb |
| ❖ pasze uzupełniające dla bydła, owiec i kóz (z wyjątkiem jw.) | - 50 ppb |
| ❖ pasze uzupełniające dla trzody chlewnej i drobiu (z wyjątkiem jw.) | - 30 ppb |
| ❖ pozostałe pasze uzupełniające | - 10 ppb |

Surowce paszowe:

- | | |
|--|-----------|
| ❖ orzeszki ziemne, kopra, orzechy kokosowe, nasiona bawełny, kukurydza i produkty ich przerobu | - 200 ppb |
| inne surowce paszowe | - 50 ppb |

Bardzo często myli się wartości normy z wartością LD₅₀. Ma to kolosalne znaczenie kliniczne. Lekarze czy hodowcy po laboratoryjnym stwierdzeniu obecności niskich nawet poziomów aflatoksyn skupiają całą swą uwagę na tym problemie. JEST TO BŁĘDNE. Normy na aflatoksyny nie mają na celu ochrony zdrowia zwierząt a ludzi !!. Dowód: najbardziej wrażliwymi zwierzętami na zatrucia aflatoksynami są 1-dniowe kacząta. Wartość LD₅₀ wynosi 360 ppb !! (u 14-dniowych już 730 ppb), tymczasem norma dla ptaków wynosi 10 do 20 ppb.

Na marginesie: czasami spotyka się sytuacje odwrotne - mikotoksyn się nie stwierdza i problem jest pomijany, tymczasem nie sposób laboratoryjnie wykluczyć obecności wszystkich mikotoksyn. Patrz także ich działanie kumulatywne.

Lekarza praktyka najbardziej zainteresowałaby konkretna informacja jaki poziom mikotoksyn należy uważać za niebezpieczny, grożący pojawianiu się klinicznych mikotoksykoz lub co najmniej stanom podklinicznym. Niestety, problem jest bardziej złożony uwzględniać bowiem należy choćby rodzaj mikotoksyny, jej stężenie, równoległą obecność innych mikotoksyn, interakcje pomiędzy nimi, jak również obserwowane objawy (problemy) w stadzie (np. wysoki poziom DON nie będzie bezpośrednio przejawiał się zaburzeniami roz-

rodu). W przypadku zearalenonu (ZEN) zwracamy uwagę nie tylko na bezwzględne jej poziomy w surowicy ale i na zmienność jego wartości – jako estrogen stymuluje organizm także poprzez skoki poziomów w surowicy. Komisje EU wypracowały pewne ramowe wartości pomagające w diagnozie mikotoksykoz jak również są pomocne w ocenie wyników badań pasz i surowców.

W żywieniu zwierząt zalecenie Komisji z dnia 17.08.2006 (2006/576/WE) określa wstępne założenia polityki w sprawie mikotoksyn (OTA, T-2, HT-2, fumonizyny, ZEN, DON) podając wartości orientacyjne dopuszczalnych zawartości tych mikotoksyn w paszach oraz surowcach.

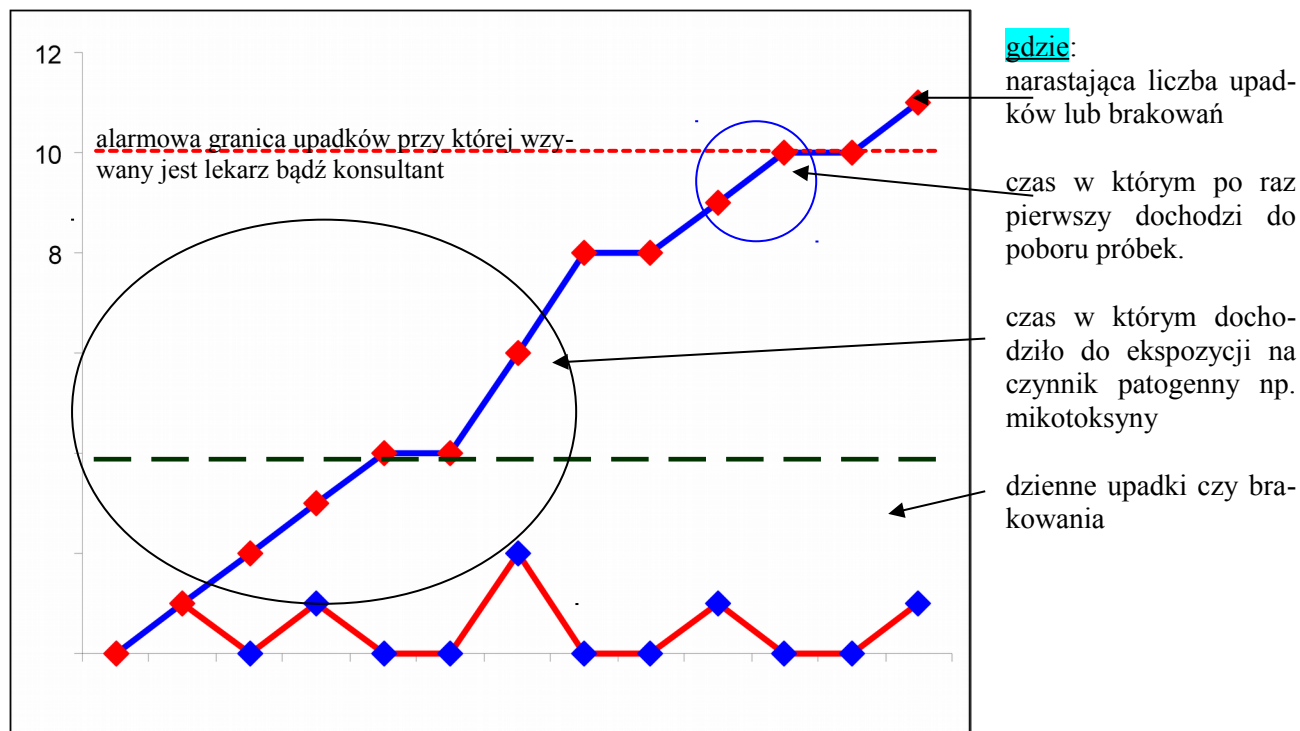
Poniżej tabela do zaleceń Komisji:

mikotoksyna	Produkt, surowiec	Wartość orientacyjna w mg/kg (ppm)
Deoksynivalenol	-zboża i produkty zbożowe	8
	- produkty uboczne kukurydzy	12
	- mieszanki paszowe dla świń	0,9
	- mieszanki paszowe dla cieląt (>4 msc), jagniąt, koźląt	2
	- pozostałe mieszanki	5
Zearalenon	- zboża i produkty zbożowe	2
	- produkty uboczne kukurydzy	3
	- mieszanki paszowe dla prosiąt i loszek	0,1
	- mieszanki dla macior i tuczników	0,25
	- mieszanki dla cieląt, bydłą mlecznego, owiec (w tym jagniąt) i kóz	0,5
Ochratoksyna A	- zboża i produkty zbożowe	0,25
	- mieszanki paszowe dla świń	0,05
	- mieszanki paszowe dla drobiu	0,1
Fumonizyny B ₁ + B ₂	- kukurydza	60
	Mieszanki paszowe dla:	
	- świń, koni, królików i zwierząt domowych	5
	- ryb	10
	- drobiu, cieląt (<4 msc), jagniąt, koźląt	20
- dorosłe przeżuwacze, norki	50	

W przypadkach badań mikotoksykologicznych warto jest również przeprowadzić badanie na obecność ergosterolu. Jest to substancja mająca bezpośrednie przełożenie na biomasę grzybów (nie ich spor jak w przypadku badania mikologicznego wg norm polskich). Można ją wykryć nawet w przypadku zabicia grzybnii i spor !!! (badania mikologiczne jałowe). W badaniach własnych surowców o złej smakowitości, nie stwierdzono obecności mikotoksyn ale wykryto znaczne ilości ergosterolu !

Surowice: Najwyższy poziom mikotoksyn w surowicy osiągnany jest już trzeciego dnia skarmiania paszy, która je zawiera. Niekiedy jeszcze w 3 tyg po zakończeniu podawania paszy zawierającej mikotoksyny stwierdza się je w surowicy jednak na poziomie nie przekraczającym 10% wartości maksymalnej początkowej (OTA). W przypadku chowu i hodowli badania mikotoksykologiczne mogą uchronić przed stratami lub przynajmniej te straty zminimalizować. Badanie surowców pozwoli unikać zakupywania tych najgorszych. Przepisy nie pozwalają na „rozcieńczanie” najgorszych pasz i surowców.

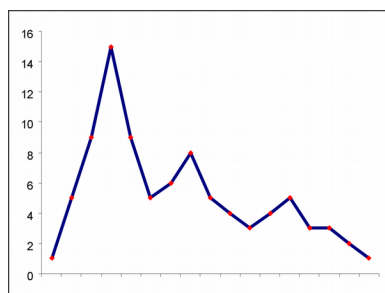
Interpretując wynik zapominamy, że w zdecydowanej większości mikotoksyny oddziałują poprzez długotrwałą ekspozycję (kumulacja działania). Mając do czynienia z chorobami tła metabolicznego, subtoksycznego itp. to problem stada będzie narastał bardzo powoli, prawie niezauważalnie. Jego przejawem będzie wzrastająca liczba osobników charłacznych, zwiększona podatność na zakażenia (przy czym obraz kliniczny i sekcyjny nie będzie zwykle jednorodny), zwiększone brakowania, duże zużycie paszy na kg/przyrostu, przedłużający się tucz itp. Ogólne wrażenie stada może być nie najgorsze ale analiza ekonomiczna potwierdza iż dzieje się coś niedobrego. Gdyby przebieg takiego schorzenia zobrazować w postaci wykresu:



Powyższy schemat wskazuje iż do poboru próbek (krew, pasza, surowce) dochodzi po przekroczeniu pewnej granicy alarmowej (nieakceptowanej z punktu widzenia hodowcy). Działanie mikotoksyn może przejawiać się jeszcze po pewnym czasie od ustania jej podawania. Metabolizm mikotoksyn jest bardzo szybki (DON – kilka godzin, OTA – do 3 tyg) a co za tym idzie po pewnym czasie nie wykryjemy obecności mikotoksyn. Na podstawie tych informacji rodzi się bardzo ważna konkluzja. Warto jest konfekcjonować próbki paszy i surowic, nawet jeżeli w danym momencie nic nie wskazuje na jakiegokolwiek zaburzenia. Jeżeli się one pojawią to mamy gotowy materiał do ustawienia badań profilu czasowego w zakresie przez nas wybranym (serologiczne, biochemiczne, toksykologiczne). Wyniki takich badań w sposób jednoznaczny pozwolą na wykluczenie bądź potwierdzenie wybranych kierunków oraz ustalenie postępowania.

Przy podejrzeniu mikotoksykozy zalecałbym konsultowanie wszelkich postępowania w zakresie poboru próbek jak i w interpretacji z doświadczonym laboratorium. Kombinacji jest tak wiele, że w artykule można jedynie wskazać kluczowe informacje. W ramach uzupełnienia przytaczam:

Częściej powtarzające się pytania.

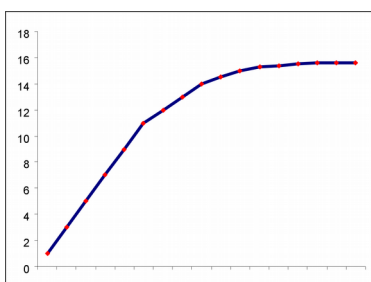


1. Czy istnieje zależność pomiędzy poziomem ZEN w paszy i surowicy ?

W przypadku zadawania paszy zawierającej ZEN istnieje wyraźna korelacja ale ZEN bardzo szybko ulega dezaktywacji i już w 3 dni po zakończeniu skarmienia wartość może być zerowa. Jednak z uwagi na zjawisko krążenia zwrotnego tej mikotoksyny (układ wrotny) dochodzi do okresowego wtórnego wzrostu poziomu tej mikotoksyny w surowicy (sinusoida). Wartości te nie są jednak wysokie i znikają po kilku dniach.

2. Czy ZEN kumuluje się w tkankach ?

ZEN (jak zresztą każda mikotoksyna- naturalny ksenobiotyk) nie kumuluje się w tkankach czy surowicy zatem nawet długotrwałe jej zadawanie nie powoduje narastania poziomów (oczywiście o ile w paszy poziom skażenia jest satały). W ciągu pierwszych 2-3 dni obserwuje się narastanie jego poziomu w surowicy i tkankach ale potem jego poziom stabilizuje się po osiągnięciu pewnej równowagi pomiędzy przyjmowaniem a eliminacją. Tu ważna informacja; poziom ZEN w surowicy jest niższy niż w wątrobie.



3. W publikacjach często spotyka się informacje o zadawaniu wysokich dawek mikotoksyn. W praktyce nie wykrywa się takich poziomów. Czy mikotoksyny są zatem realnym zagrożeniem ?

Prace naukowe wykonywane są zazwyczaj w oparciu o syntetyczne mikotoksyny, które posiadają nieaktywne formy izomeryczne!!.. zatem w warunkach doświadczeń nawet duże ich dawki nie powodują wyraźnych zmian (tym bardziej, że z uwagi na koszty (badań, mikotoksyn, obserwacji, zwierząt) zwykle ekspozycja na mikotoksyny jest krótka a stawka zwierząt mała).

4. Jak interpretować poziom ZEN w surowicy macior ?

Brak dużych i systematycznych obserwacji terenowych nie pozwala na zawsze precyzyjną ocenę. W interpretacji oprócz suchego wyniku liczy się ocena sytuacji w chlewni (- jak długo skarmiana jest seria paszy, kiedy była ostatnia zmiana, jak częste są zmiany serii, czy pasza jest rzeczywiście jednorodna, jaki jest sposób zadawania paszy, czy istnieje możliwość pozostawiania resztek paszy w karmidlach czy drogach przesyłowych, czy obserwowany problem jest incydentalny czy istotny, czy do badań dostarczono dostateczną ilość próbek krwi itp.)

Z dostępnych danych wynika, iż nawet przy 5 ppb w surowicy obserwowano dość wyraźne zaburzenia. Brak również innych danych jak choćby poziom wit. E, czy innych czynników mogących mieć wpływ na płodność. Niemniej przy wartościach ponad 15 ppb do laboratorium dotarły informacje o kłopotach w sferze płodności z kilku niezależnych źródeł.

Następnym problemem w interpretacji jest zmienność poziomów ZEN. Jako analog hormonów działa podobnie jak i one. Tylko skoki poziomów są w stanie wywołać działanie estrogenne. Zatem nawet dość wysokie poziomy ale utrzymywane na stałym poziomie to raczej nikły efekt estrogeny. Ale jego działanie to nie tylko zaburzenie rui ale przede wszystkim owulacji, dojrzewania pęcherzyków itp. a więc funkcji pierwszorzędowych i obserwowalnym przy wysokim stężeniu lub po długotrwałym oddziaływaniu.

5. Jakie jest znaczenie pojedynczej obserwacji o poziomie mikotoksyn ?

Na podstawie pojedynczego badania nie można wyciągać zasadniczych wniosków. Wyjątkiem są bardzo wysokie poziomy na podstawie których w sposób jednoznaczny da się ustalić ich rolę w patogenezie.

6. Badać surowiec, paszę czy surowicę ?

Zawartość mikotoksyny w surowicy jest uśrednieniem jej zawartości w paszy. Analizowana próbka to 50 g, tymczasem np. locha zjada do kilku kilogramów paszy a więc badanie surowicy uwiarygodnia wynik. W tym przypadku można spulować (połączyć) kilka próbek osiągając jeszcze precyzyjniejsze informacje. Badanie surowicy ma sens w stosunku do OTA i ZEN.

Badanie surowca jest nieodzowne w momencie zakupu, konstruowania mieszanki itp. Pobranie próbek paszy jest najprostsze (duża jednorodność) i badanie może obejmować szerszy wachlarz mikotoksyn a także badania mikrobiologiczne.