

## MULTITOXICITÁSI TESZTRENSZER A MIKOTOXINOK HATÁSAINAK KIMUTATÁSÁRA BAROMFIBAN

1. **Kísérleti állatok:** baromfi fajjal végzendő vizsgálatokhoz azonos genotípusba tartozó, azonos ivarú (célszerűen hím), klinikailag egészséges, azonos keltetésből származó és azonos életkorú brojlersirke használható fel.

2. **Mikotoxin dózisok meghatározása:** a kísérletek során felhasználandó mikotoxin dózisok meghatározása során tekintetbe vehető egyrészt az adott mikotoxinra vonatkozó toxikológiai szempontból kritikus érték a Lowest Observed Adverse Effect Level (LOAEL) értéke. Ez az érték néhány mikotoxin esetében már rendelkezésre áll (1. táblázat). A takarmány mikotoxin szennyezettségi értéke a vizsgálathoz a baromfi átlagos napi takarmányfelvételének mértéke alapján határozható meg, amely 25-30 napos brojlersirke esetében 89-107 g (Abudabos et al., 2013).

1. táblázat Egyes fontosabb mikotoxinok LOAEL értéke baromfiban

Mikotoxin	Kritikus érték (LOAEL)	Hivatkozás
Zearalenon	2000 µg/kg ttm./nap	Kuiper-Goodman et al (1987)
DON + 3-Ac-DON+ 15-Ac-DON	2900 µg/kg ttm./nap	EFSA (2017)
T-2 + HT-2 toxin	40 µg/kg ttm./nap	EFSA (2011)
Fumonizin B1	2000 µg/kg ttm./nap	EFSA (2005)

Amennyiben a LOAEL érték nem áll rendelkezésre, akkor az Európai Unió által, baromfi takarmányokra meghatározott, javasolt, illetve aflatoxin B<sub>1</sub> esetén a kötelező érvényű maximális szennyezettségi érték tekintetbe vétele (2. és 3. táblázat)

2. táblázat Egyes mikotoxinok javasolt maximális mennyisége baromfi takarmányokban

Mikotoxin	Takarmány alapanyag/takarmány (12% nedvesség tartalmú takarmányra vonatkozóan)	Javasolt maximális mennyiség (mg/kg takarmány)
T-2 és HT-2 toxin	Keveréktakarmányok	0,25
Deoxinivalenol (+ 3AcDON + 15AcDON)	Kiegészítő és teljes értékű takarmányok	5
Zearalenon	Baromfi takarmányokra nem határozott meg értéket	
Fumonizin B1+B2	Baromfi takarmányok	20
Ochratoxin A	Baromfi takarmányok	0,10

### 3. táblázat Az aflatoxin B<sub>1</sub> maximális mennyisége baromfi takarmányokban

Mikotoxin	Takarmány alapanyag/takarmány (12% nedvesség tartalmú takarmányra vonatkozóan)	Javasolt maximális mennyiség
<b>Aflatoxin B<sub>1</sub></b>	Kiegészítő és teljes értékű takarmányok növendék baromfiknak szánt összetett takarmányok	0,1 mg/kg 0,005 mg/kg

2002/32/EK Irányelv; 574/2011/EU rendelet

**3. Multi-mikotoxin dózisok meghatározása:** az alkalmazott dózisok az egyes mikotoxinokra vonatkozóan célszerűen a LOAEL, vagy ennek hiányában az EU által meghatározott javaslati, vagy kötelező érvényű, határértékkel megegyező mennyiség, illetve annak arányos része. A vizsgálatok során az egyes mikotoxinokat 0,5x, 1x, 2x és 5x mennyiségben célszerű alkalmazni. A multi-mikotoxin keverék kialakítása során 0,5:0,5; 1:1; 1:2, 2:1; 1:5 és 5:1 arányokat javasolt alkalmazni. Több mikotoxin esetében azonos arányok betartása javasolt, de olyan módon, hogy egy mikotoxinból mindenképpen az 1x dózis legyen jelen a keverékben.

Minden egyes multi-mikotoxin terheléses csoport mellé az egyes mikotoxinokat azonos mennyiségben tartalmazó takarmányokkal etetett kontroll csoport beiktatása is szükséges az egyedi hatásokkal való összehasonlíthatóság érdekében.

**4. Multi-mikotoxin terhelési idő:** az általunk kialakított multi-mikotoxin tesztrendszerben két rövidtávú (24 és 72 óra), valamint hosszabb távú (7, illetve 14 nap) terhelési időket alkalmaztunk.

**5. Mintavételek:** a mintavételekre a rövidtávú vizsgálatok során 8 óránként, a hosszabb távú vizsgálatoknál pedig az 1.,3.,7. és 14 napon. A mintavételek során a biokémiai vizsgálatokhoz vér, a biokémiai és génexpressziós vizsgálatokhoz pedig májmintát kell venni.

### 6. Módszerek:

**Biokémiai vizsgálatok:** a lipidperoxidáció folyamatának iniciációs fázisát a máj konjugált dién és konjugált trién tartalmának mérésével (AOAC, 1984), annak terminációs fázisát a vérplazma és a vörösvérsejt (vvt.) hemolizátum (Placer et al., 1966), illetve a máj 1:9 homogenizátum (Botsoglou, 1994) malondialdehid tartalmának változásával követtük nyomon. A glutation redox rendszer tagjai közül mértük a redukált glutation (GSH) tartalmat (Rahman et al., 2006), valamint a glutation-peroxidáz (GPx) aktivitást (Lawrence és Burk, 1978), a vérplazmában, a vvt. hemolizátumban és a máj 1:9 homogenizátum 10.000 g szupernatans frakciójában. A GSP és GPx szinteket a minták fehérje tartalmára vonatkoztattuk, amelyet a vérben Weichselbaum (1948), a májhomogenizátumban pedig Lowry et al (1952) módszere szerint határoztunk meg.

**Génexpressziós vizsgálatok:** a májminták összes RNS tartalmát Trizol reagenssel (Molecular Research Centre, Cincinnati) tisztítottuk a gyártó leírása szerint. Az RNS-t DNase-al kezeltük a gyártó (Thermo Fisher Scientific, San Jose) protokollja szerint a genomi DNS szennyeződés eltávolítása érdekében. Az RNS integritását agaróz gél elektroforézissel és fotometriás méréssel (260:280 nm) ellenőriztük. A cDNS-t standard protokoll szerint RevertAID reverz transkriptáz és random nanomer primer segítségével hoztuk létre. A primereket a vizsgálandó génekhez (kelch-like ECH-Associated protein 1 [*keap1*]; nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2 [*nrf2*]; glutathione peroxidáz4 [*gpx4*], glutation szintetáz [*gss*] és glutation reduktáz [*gsr*], valamint a referencia gén (*b-actin*) a GenBank adatbázisban elérhető adatok alapján terveztük. A PCR reakciót StepOne Plus™ real - time PCR rendszerben (Thermo Fisher Scientific, San

Jose) végeztük. A qPCR reakciót Maxima Probe qPCR Master Mix reakció eleggyel végeztük, kettős jelöléssel (6 - fluorescein phosphoramidite (FAM) vagy 2'-chloro-7' phenyl-1,4-dichloro-6-carboxy-fluorescein (VICAM)). A relatív énpexpressziót az egyes génekre vonatkozóan a kontroll génhez viszonyítva StepOnePlus™ Software v2.2 (Thermo Fisher Scientific, San Jose) számítottuk összehasonlító Ct módszerrel, Livak és Schmittgen (2001) szerint.

## 6. Mérendő paraméterek:

- 6.1. Általános egészségi állapot, morbiditás és mortalitás.
- 6.2. Takarmányfelvétel
- 6.3. Súlygyarapodás (csak hosszabb távú vizsgálatok során)
- 6.4. Biokémiai paraméterek minden mintavételi időpontban
- 6.5. Relatív génexpressziós paraméterek minden mintavételi időpontban

## 7. Értékelés:

Az egyes mért paraméterek változását elsőként leíró statisztikai módszerrel (átlag és SD) értékeltük GraphPad Prism 6.07 programcsomaggal (GraphPad Software, San Diego). Az egyes paraméterek értékeinek normál eloszlását Kolmogorov - Smirnov teszttel, a variancia homogenitását Barlett teszttel értékeltük. Azokat az adatokat, amelyek ezeknek a követelményeknek megfeleltek egyutas ANOVA módszerrel hasonlítottuk össze mintavételi időpontként az egyes kísérleti csoportok között. A csoportok közötti eltérés szignifikancia szintjét Tukey - Multiple Comparison post - hoc teszttel határoztuk meg, ahol a  $p < 0,05$  szintet tekintettük szignifikánsnak. Azokban az esetekben, amikor ez a módszer nem volt használható nem-parametrikus Kruskal - Wallis teszttel páronként hasonlítottuk össze az egyes csoportok értékeit.

Az egyes mikotoxinok közötti interakciók vizsgálatához a Bliss független modellt (Zhao et al., 2014) alkalmaztuk, amennyiben a mért paraméterek értékei, illetve a csoportok közötti különbségek erre lehetőséget biztosítottak.

## Irodalom

*2002/32/EK*: Az Európai Parlament és a Tanács 2002/32/EK irányelve (2002. május 7) a takarmányban előforduló nemkívánatos anyagokról.

*2006/576/EK*: A Bizottság ajánlása (2006. augusztus 17) a deoxinivalenol, a zearalenon, az ochratoxin-A, a T-2, a HT-2 és a fumonizinek állati takarmányozásra szánt termékekben való előfordulásáról.

*1881/2006/EK*: A Bizottság 1881/2006/EK rendelete (2006. december 19) az élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok felső határértékeinek meghatározásáról.

*574/2011/EU*: A Bizottság 574/2011/EU rendelete (2011. június 16) a 2002/32/EK európai parlamenti és tanácsi irányelv I. mellékletének a nitrit, a melamin és az Ambrosia spp. maximális szintjének, valamint bizonyos kokcidiosztatikumok és hisztomonosztatikumok átvitelének tekintetében történő módosításáról, továbbá az irányelv I. és II. mellékletének egységes szerkezetbe foglalásáról.

AOAC (1984). Official methods of Analysis 28054 B. 14<sup>th</sup> ed. Arlington, USA

Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J., Papageorgiou, G.E., Vassilopoulos, V.N., Mantis, A.J., Trakatellis, A.G. (1994). J. Agric. Food Chem. 42: 1931–1937.

EFSA (2005). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to fumonisins as undesirable substances in animal feed. EFSA J. 4(7):235, 32 pp.

EFSA CONTAM Panel (2011). Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. EFSA J. 9(12):2481, 187 pp.

EFSA CONTAM Panel (2017). Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. EFSA J. 5(9):4718, 345 pp.

Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., Watanabe, H. (1987). Regul. Toxicol. Pharmacol. 7: 253-306.

Abudabos, A.M., Okab, A.B., Aljumaah, R.S., Samara, E.M., Abdoun, K.A., [Ahmad A. Al-Haidary](#), A.A. (2013). Ital. J. Anim. Sci. 12. 2 doi: 10.4081/ijas.2013.e28

Lawrence, R., Burk, R. (1978). J. Nutr. 108. 211-215.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001): *Methods* 25. 402–408.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). J. Biol. Chem. 193. 265-275.

Placer, Z.A., Cushman, L.L., Johnson, B.C. (1966). Anal. Biochem. 16. 359-364.

Rahman, I., Biswas, S.K., Kode, A. (2006). Eur. J. Pharmacol. 533. 222–239.

Weichselbaum, T.E. (1948). *Am. J. Clin. Pathol.* 16. 40-43.

Zhao, W., Sachsenmeier, K., Zhang, L., Sult, E., Hollingsworth, R.E., Harry Yang, H. (2014). J. Biomol. Screening 19. 817–882.