

Detekcia zearalenónu v suchých krmivách pre psov

Michaela Harčárová¹
Lukáš Bujňák²
Alena Hreško Šamudovská³
Alica Tvrdá⁴

¹Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácií Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; michaela.harcarova@uvlf.sk

²Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácií Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; lukas.bujnak@uvlf.sk

³Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácií Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; alena.hreskosamudovska@uvlf.sk

⁴Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácií Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; alica.tvrda@student.uvlf.sk

Grant: VEGA č. 1/0698/24

Název grantu: Sledovanie účinku kŕmnych doplnkových látok prírodného pôvodu a alternatívnych kŕmnych komponentov na produkciu a zdravie monogastrických zvierat

Oborové zamčrení: GH - Výživa hospodárskych zvierat

© GRANT Journal, MAGNANIMITAS Assn.

Abstrakt Chov spoločenských zvierat by mal zahŕňať aj starostlivosť o ich zdravie. Jedným zo základných prvkov pre zachovanie dobrého zdravotného statusu zvierat je používanie kvalitných krmív. V súčasnej dobe sa globálnym problémom, v súvislosti s bezpečnosťou podávaných krmív, stáva výskyt mykotoxínov. Zearalenón je jedným z celosvetovo najrozšírenejších mykotoxínov. Táto práca bola zameraná na stanovenie zearalenónu v 14 vzorkách priemyselne vyrábaných krmivách pre dospelých psov. Zearalenón bol detegovaný v 4 vzorkách prémiových krmív v rozsahu koncentrácií od 21,799 µg/kg do 163,463 µg/kg. Je potrebné skonštatovať, že výsledné koncentrácie zearalenónu vo vzorkách krmív pre psov nepresahujú aktuálne platné smerodajné hladiny zearalenónu v krmivách pre spoločenské zvieratá uvedené v Odporúčaní Komisie (EÚ) 2016/1319.

Kľúčová slova Krmivo, pes, zearalenón

1. ÚVOD

V súčasnosti bývajú spoločenské zvieratá (psy alebo iné spoločenské zvieratá) ich majiteľmi často definované ako členovia rodiny (Yang a kol., 2023). Je pozoruhodné, že v sérii štúdií bolo preukázané, že prítomnosť domácich zvierat počas života človeka prispieva k zníženiu srdcovej frekvencie, krvného tlaku, depresie a problémov s duševným zdravím, čo sa pripisuje pozitívnym interakciám medzi majiteľmi a spoločenskými zvieratami (Witaszak a kol., 2020). Vzhľadom na silný emocionálny vzťah medzi domácimi zvieratami a majiteľmi, majitelia venujú viac pozornosti zdraviu domácich zvierat (White a kol., 2016). Na zabezpečenie dobrého zdravotného stavu zvierat, sa okrem iných faktorov považuje za dôležité podávanie kvalitného a bezpečného krmiva pre domáce zvieratá (Grandi a kol., 2019).

Pre správne priemyselné spracovanie krmiva pre psov bývajú nevyhnutnou zložkou obilniny. Vo výžive psov sa používa niekoľko rôznych obilnín, ako je ryža, kukurica, pšenica, jačmeň a ovos, pretože sú dobrým a lacným zdrojom energie. Vo väčšine suchých krmív je podiel sacharidov zvyčajne 30 – 60 % (Kempe a kol., 2004). Vysoký podiel obilnín v priemyselne vyrábaných krmivách pre psov predstavuje potenciálne riziko výskytu mikroskopických vláknitých húb a ich sekundárnych metabolitov. Najvýznamnejšími patogénmi obilnín sú okrem iných mikroskopických húb, zástupcovia rodu *Fusarium*. Väčšina druhov fuzárií sú potenciálne toxínogénne, teda sú schopné syntézy mykotoxínov.

Zearalenón je jedným z najčastejšie sa vyskytujúcich sekundárnych metabolitov mikromycét rodu *Fusarium*. Produkuje ho niekoľko druhov mikroskopických vláknitých húb vrátane *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis* a *F. equiseti*. Tento nesteroidný estrogénový mykotoxín sa vyskytuje predovšetkým v kukurici, pšenici, ovse a v jačmeni. Jeho syntéza súvisí s nízkymi teplotami a vysokou vlhkosťou prostredia (Yazar a kol., 2008). Zearalenón je termostabilná zlúčenina, ktorá sa nerozkladá počas spracovania kŕmnych surovín a krmiva, a to ani pri vysokých teplotách (Thapa a kol., 2021). Sučky sú obzvlášť citlivé na estrogény a zvýšené koncentrácie endogénnych a/alebo exogénnych hormónov môžu tiež zvýšiť riziko iných systémových porúch (Gajecka a kol., 2015). Po vstupe do tela môže zearalenón spôsobiť akútnu vulvovaginitídu, poruchy estrálneho cyklu a zhoršenú plodnosť (Svoboda a kol., 2001). Účinky zearalenónu u väčšiny zvierat sú podobné účinkom, ktoré vznikajú po vystavení organizmu vysokým koncentráciám estrogénu, prejavujú sa neplodnosťou, abnormálnou laktáciou, mŕtvo narodenými plodmi, potratmi, mastitídou, vaginitídou a vaginálnym alebo rektálnym prolapsom (Bissoqui a kol., 2016).

Podľa EFSA (Európsky úrad pre bezpečnosť potravín) sa psy považujú za zvieratá citlivé na účinky zearalenónu. Na základe lézií myometria a endometria, zväčšenia alebo atrofie maternicových žliaz, hematologických a biochemických parametrov krvi, bola u

dospelých sučiek odhadnutá najnižšia pozorovaná hladina nežiaducich účinkov (LOAEL) na 25 µg/kg telesnej hmotnosti za deň (EFSA, 2017). Keďže prítomnosti zearalenónu v krmivách sa nedá úplne vyhnúť, v EÚ boli vypracované usmernenia pre smerodajné hladiny mykotoxínov v krmných zmesiach pre rôzne zvieratá vrátane psov (Tabuľka 1) (Odporúčanie Komisie, 2016).

Tabuľka 1 Smerodajné hodnoty zearalenónu v krmných zmesiach pre zvieratá

Mykotoxín	Výrobky určené na kŕmenie zvierat	Smerodajná hodnota v µg/kg (ppb) krmiva v prepočte na 12 % obsah vlhkosti
Zearalenón	Kŕmne zmesi pre:	
	• odstavčatá a prasničky, šteňatá, mačiatka, psy a mačky na reprodukciu	100
	• dospelé psy a mačky, iné ako na reprodukciu	200
	• prasnice a ošípané na výkrm	250
	• teľatá, dojnice, ovce (vrátane jahniat), kozy (vrátanie kozliat)	500

Zdroj: Vlastná tabuľka, prepracované podľa Odporúčania Komisie (EÚ) 2016/1319 z 29. júla 2016, ktorým sa mení odporúčanie 2006/576/ES, pokiaľ ide o deoxynivalenol, zearalenón a ochratoxín A v krmive pre spoločenské zvieratá

Cieľom tejto práce bola detekcia a kvantitatívne stanovenie zearalenónu v 14 vzorkách suchého krmiva pre dospelé psy prostredníctvom imunoenzymatickej analýzy ELISA.

2. MATERIÁL A METODIKA

2.1 Vzorky

Celkovo bolo vyšetrených 14 vzoriek suchého krmiva pre psov vo forme granúl. Vzorky boli získané od rôznych komerčných a špecializovaných predajcov a boli určené na kŕmenie dospelých psov. Vzorky boli rozdelené do troch kategórií: generické, populárne a prémiové. Skupina generických krmív zahŕňala vzorky krmív, ktoré neboli označené názvom výrobcu a boli predávané lokálne alebo regionálne. Druhá kategória, tzv. populárne krmivá, zahŕňala vzorky krmív predávaných v sieťach obchodov s potravinami. Tretia kategória zahŕňala prémiové krmivá od špecializovaných predajcov.

2.2 Príprava vzoriek

Príprava vzoriek prebiehala podľa protokolu komerčnej súpravy Veratox pre zearalenone (Neogen corporation, USA). Postup prípravy vzorky bol nasledovný: k 5 g zomletej vzorky sa pridal 70 % metanol v množstve 25 ml. Vzorky sa trepli 3 minúty na orbitálnej trepačke (Orbital Shaker – Biosan) a filtrovali sa cez filtračný papier Whatman 1. Filtráty sa zriedili destilovanou vodou v pomere 1:5. Na kvantitatívne stanovenie zearalenónu pomocou imunoanalýzy ELISA sa použilo 50 µl zriedených vzoriek.

2.3 ELISA analýza

Princíp analýzy ELISA v prípade vzoriek skúmaných na prítomnosť zearalenónu je založený na reakcii antigénu a protilátky. Štandardné roztoky, ktoré boli použité pri analýze obsahovali zearalenón v nasledujúcich koncentráciách: 0 ppb; 25 ppb; 75 ppb; 150 ppb a 500 ppb. Výsledné koncentrácie zearalenónu (ppb; µg/kg) boli odčítané pri absorbanzii 650 nm a boli vyhodnotené pomocou ELISA čítačky (Dynex Technologies, Inc., Virginia, USA).

3. VÝSLEDKY

V tabuľke číslo 2 sú uvedené výsledky kvantitatívneho stanovenia zearalenónu vo vzorkách suchých krmív pre dospelých psov. Z uvedených výsledkov vyplýva, že v nami vyšetrených 2 vzorkách generických, 2 vzorkách populárnych krmív a 6 vzorkách prémiových krmív zearalenón nebol detegovaný, resp. koncentrácie boli pod detekčným limitom použitého testu (5 µg/kg). V 4 vzorkách prémiových krmív pre psov sa vyskytoval zearalenón v nasledovných koncentráciách: 21,799 µg/kg; 69,187 µg/kg; 96,745 µg/kg a 163,463 µg/kg. Je dôležité poznamenať, že stanovené koncentrácie zearalenónu nepresahujú smerodajné hodnoty, ktoré sú uvedené v Odporúčaní Komisie 2016/1319 (Tabuľka 1).

Tabuľka 2 Stanovenie koncentrácií zearalenónu (µg/kg) vo vzorkách priemyselne vyrábaných krmív pre dospelých psov mimo reprodukcie

Typ krmiva pre psov	Vzorky (n=14)	Koncentrácie zearalenónu
generické	2	< 5 µg/kg
populárne	2	< 5 µg/kg
prémiové	6	< 5 µg/kg
	4	> 5 µg/kg

4. DISKUSIA

Zearalenón je mykoestrogén, ktorý je toxický pre samice aj samce (Stopa a kol., 2014). Podľa štúdie Boermansa a Leunga (2007), dávka ~1 mg/kg zearalenónu v krmive môže u spoločenských zvierat spôsobiť neplodnosť, negatívne ovplyvniť ovuláciu, implantáciu, graviditu a následne životaschopnosť mláďat. Okrem toho sa popisuje, že denný príjem nízkych dávok zearalenónu, by mohol postupne poškodiť zdravie psa a vyvolať zmeny v metabolických procesoch (Gajecka a kol., 2015; Witaszak a kol., 2020).

V nami vyšetrených vzorkách bol zearalenón detegovaný v 4 vzorkách prémiových krmív pre psov v rozsahu koncentrácií od 21,799 µg/kg do 163,463 µg/kg. Bissoqui a kol. (2016) skúmali 100 vzoriek suchého krmiva pre psov získaných z Brazílie a uviedli, že koncentrácia zearalenónu sa pohybovala od 5,4 µg/kg do 442,2 µg/kg a priemerná hodnota bola 49,2 µg/kg. Zearalenón bol prítomný aj vo všetkých prémiových krmivách (100 %) a v 88,2 % krmív zo supermarketov v Španielsku (Macías-Montes a kol., 2020). Podobná štúdia uvádza, že vo viac ako polovici (62,5 %, 25 z 32) komerčných krmív pre psov bol prítomný zearalenón s priemernou hodnotou 54,5 µg/kg. V rámci tejto štúdie bol zearalenón stanovený v maximálnej hodnote 389,2 µg/kg (Shao a kol., 2018). V 26 suchých krmivách pre psov zozbieraných z poľského trhu sa koncentrácie zearalenónu pohybovali od 0,3 do 30,3 µg/kg (Witaszak a kol., 2020). Okrem toho v ďalšom prieskume, ktorý vykonali Geicu a kol., (2020) sa ukázalo, že priemerná, minimálna a maximálna hodnota zearalenónu v 34 suchých krmív

pochádzajúcich z predajní v Rumunsku bola 90,89 µg/kg; 0,0 µg/kg resp. 230,24 µg/kg (Geicu a kol., 2022).

Witaszak a kol., 2022 pripomínajú, že prítomnosť zearalenónu v krmivách pre psov v nízkych hladinách nevylučuje riziko zdravotných komplikácií a denné užívanie nízkych dávok zearalenónu by mohlo postupne narušiť zdravie psov (Witaszak a kol., 2020). Toto tvrdenie podporuje aj štúdia Gajecka a kol. 2004, ktorí zaznamenali zmeny v reprodukčnom systéme psov už po 7 dňoch pri denných dávkach 200 µg/kg telesnej hmotnosti a účinky na koncentrácie pohlavných hormónov v krvi po vystavení menším dávkam počas dlhšieho časového obdobia 15 µg/kg telesnej hmotnosti počas 42 dní). Vzhľadom na prítomnosť zearalenónu v našich vzorkách a vo vzorkách zo zahraničného výskumu by bolo potrebné pravidelné monitorovanie mykotoxínov v suchom krmive pre psov.

5. ZÁVER

Zachovanie a podpora dobrého zdravotného stavu spoločenských zvierat úzko súvisí aj s podávaním kvalitného a bezpečného krmiva. Skrytou hrozbou a potenciálnym rizikom narušenia zdravia býva prítomnosť sekundárnych metabolitov mikroskopických húb - mykotoxínov v krmivách. Mykotoxíny sú dlhodobo celosvetovým problémom a ich prítomnosti v krmivách sa nedá úplne zabrániť. Preto je potrebné vykonávanie monitoringu v súvislosti s ich výskytom nielen v procese tvorby krmív, ale aj počas skladovania.

Zdroje

1. BISSOQUI, L. Y., FREHSE, M. S., FREIRE, R. L., ONO, M. A., BORDINI, J. G., HIROZAWA, M. T., ONO, E. Y. Exposure assessment of dogs to mycotoxins through consumption of dry feed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96, 12, 4135-4142.
2. BOERMANS, H. J., LEUNG, M. C. Mycotoxins and the pet food industry: Toxicological evidence and risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 119, 95-102.
3. COMMISSION RECOMMENDATION (EU) 2016/1319 Of 29 July 2016 AMENDING RECOMMENDATION 2006/576/EC AS REGARDS DEOXYNIVALENOL, ZEARELENONE AND OCHRATOXIN A IN PET FOOD. Dostupné na: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016H1319>
4. EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM). Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. *EFSA Journal*, 15, 7, e04851.
5. GAJECKA, M., JAKIMIUK, E., POLAK, M., OTROCKA-DOMAGALA, I., JANOWSKI, T., ZWIERZCHOWSKI, W. Zearalenone applied per os provides adverse effects in structure of chosen parts of bitch reproductive system. *Polish Journal of Veterinary Science*, 2004, 7, 59-66.
6. GAJECKA, M., ZIELONKA, Ł., GAJECKI, M. The Effect of Low Monotonic Doses of Zearalenone on Selected Reproductive Tissues in Pre-Pubertal Female Dogs—A Review. *Molecules*, 2015, 20, 11, 20669-20687.
7. GEICU, O. I., BILTEANU, L., STANCA, L., IONESCU PETCU, A., IORDACHE, F., PISOSCHI, A. M., SERBAN, A. I. Composition-based risk estimation of mycotoxins in dry dog foods. *Foods*, 2022, 12, 1, 110.
8. GRANDI, M., VECCHIATO, C. G., BIAGI, G., ZIRONI, E., TONDO, M. T., PAGLIUCCO, G., GAZZOTTI, T. Occurrence of mycotoxins in extruded commercial cat food. *ACS omega Journal*, 2019, 4, 9, 14004-14012.
9. KEMPE, R., SAASTAMOINEN, M., HYYPPÄ, S. Composition, digestibility and nutritive value of cereals for dogs. *Agricultural and Food Science*, 2004, 13, 5-17.
10. MACÍAS-MONTES, A., RIAL-BERRIEL, C., ACOSTA-DACAL, A., HENRÍQUEZ-HERNÁNDEZ, L. A., ALMEIDA-GONZÁLEZ, M., RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, Á., LUZARDO, O. P. Risk assessment of the exposure to mycotoxins in dogs and cats through the consumption of commercial dry food. *Science of the Total Environment*, 2020, 708, 134592.
11. SHAO, M., LI, L., GU, Z., YAO, M., XU, D., FAN, W., SONG, S. Mycotoxins in commercial dry pet food in China. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2018, 11, 4, 237-245.
12. STOPA, E., GAJECKA, M., BABIŃSKA, I., ZIELONKA, Ł., GAJECKI, M. The effect of experimental exposure to low doses of zearalenone on uterine histology and morphometry in prepubertal bitches. *Theriogenology*, 2014, 82, 537-545.
13. THAPA, A., HORGAN, K. A., WHITE, B., WALLS, D. Deoxynivalenol and Zearalenone—Synergistic or Antagonistic Agri-Food Chain Co-Contaminants? *Toxins*, 2021, 13, 8, 561.
14. WHITE, G. A., WARD, L., PINK, C., CRAIGON, J., MILLAR, K. M. "Who's been a good dog?"—Owner perceptions and motivations for treat giving. *Preventive veterinary medicine*, 2016, 132, 14-19.
15. WITASZAK, N., WAŚKIEWICZ, A., BOCIANOWSKI, J., STEPIEŃ, Ł. Contamination of pet food with mycobiota and Fusarium mycotoxins—Focus on dogs and cats. *Toxins*, 2020, 12, 2, 130.
16. YAZAR, S., OMURTAG, G. Z. 2008: Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *International Journal of Molecular Science*, 2008, 9, 2062-2090.