

RADOVI

KNJIGA LXII

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

Knjiga 20.

Urednik

SEID HUKOVIĆ,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine



Sarajevo
1977.

OŽEGOVIĆ LADISLAV¹, DŽUVIĆ ABDULAH² i MATUKA OLGA³

TOKSIČKI EFEKTI SOJEVA *ALTERNARIAE TENUIS* IZOLIRANIH IZ PLJESNIVE ZOBİ

(Primljeno na sjednici Odjeljenja medicinskih nauka 17. V 1977. godine)

KRATAK SADRŽAJ

Opisana je epizootija trovanja konja u jednoj ergeli i manjem uzgoju, koja je nastala uzimanjem pljesnive zobi, sa koje su izolirane plijesni *Alternaria tenuis*, *Fusarium moniliforme* i *Trichothecium roseum*. Izoliranim sojem *Alternariae tenuis* inokuliran je zdrav kukuruz i dat u hrani bijelim miševima i mladim pilićima starim 5 dana. Kukuruz inokuliran *Alternarijom tenuis* nakon 15 dana inkubiranja ekstrahiran je 2%-nim metanolom u kloroformu i dat miševima intubacijom. Toksički efekti su bili veoma izraziti u pilića, a nešto slabiji u bijelih miševa. Toksički efekti su se manifestovali gastrointestinalnim, hepatotoksičkim, nefrotičkim i lezijama miokarda.

Tankoslojnom kromatografijom iz ekstrakta je metodom Meronucka i saradnika dokazana tenuazonska kiselina.

Poznata su alergogena, sistemna i toksička djelovanja sojeva *Alternariae*, ali toksički sojevi kao uzročnici oboljenja u domaćih životinja malo su poznati ili nepoznati. Forgacs sa saradnicima (1958, 1962. i 1962 a) je istraživao hemoragički sindrom brojlera i sojevima *Alternariae* pridao određeno značenje. Drugi autori su obradili alternariju kao kontaminanta svježih žitarica (Christensen 1951, Christensen i Kaufmann 1969) ili dokazali toksičnost za guske (Palysik i saradnici 1968), piliće (Dopnik i Sobers 1968) i bijele miševе (Slifkin i Spalding 1970). Joffe (1960) je nakon eksperimentalnih istraživanja na životinjama smatrao da i

¹ Prof. dr L. Ožegović, Klinika za unutrašnje bolesti i Mikološki laboratorij;

² Prof. dr A. Džuvić, Patološki institut;

³ Dr Olga Matuka, naučni saradnik Zavoda za zaraze i mikrobiologiju, Veterinarskog fakulteta Univerziteta u Sarajevu.

neki sojevi alternarija mogu imati u sinergizmu s ostalim toksinima plijesni, posebno *Fus. tricinctum* (sporotrichiela), određeno značenje u nastanku toksičke alimentarne aleukije. Metabolitima alternarije kao toksičkim agensima bavili su se Meronuck i saradnici (1972), Pero i saradnici (1973) i Seitz i saradnici (1975).

Do sada u pristupačnoj literaturi nije bio opisan ni jedan slučaj prirodnog trovanja domaćih životinja žitaricama koje su bile infestirane alternarijom.

KAZUISTIKA, METODE I REZULTATI

16 konja jedne organizacije naglo je počelo mršaviti. Tjelesne temperature su varirale od 38,5—40°C. Uz mršavljenje, pomanjkanje apetita i depresiju, u nekim slučajevima bilo je i tekućeg smrdljivog proljeva. Jedna kobila koja je hranila 15 mjeseci staro ždrijebe, pokazivala je znakova akutnog gastroenteritisa. Ždrijebe je hranjeno samo mlijekom od kobile i nakon par dana je bilo potpuno apatično, ikterično, imalo smrdljivi proljev. Tjelesna temperatura je iznosila 40,5°C. Ždrijebe je uginulo nakon bolovanja od 5 dana uprkos svim simptomatskim mjerama. Obdukcija je pokazala generalizirani ikterus, teški gastroenteritis, hepatozu i nefrozu, te encefalozu.

U pokušaju da se uđe u trag uzrocima intoksikacije utvrđeno je: Prije nego što je oboljenje počelo, konji su hranjeni dobrim sijenom, ali je tada kupljena nova zob. Oboljenje počinje od kada je ta zob uvedena u ishranu. Analizom zobi utvrđeno je da pljesnivo smrdi i da ima crno-smeđi izgled. Metodom Christensena (1951) utvrđena je 100% infestacija zrna *Alternaria tenuis*. Sa pojedinačnih zrna utvrđena je prisutnost još i *Fusarium moniliforme* i *Trichothecium roseum*.

Zob je bila kupljena s ergele, na kojoj je nekoliko sedmica ranije bio opažen sličan sindrom. Nekih 200 životinja su bile slabog apetita, neke i kakektične, sa simptomima katara želuca i crijeva. Najteži oblici su bili uočeni na pastusima, koji su dobivali najviše zobi. Nije bilo ugičanja, a uz gastrointestinalne poremetnje u pastuha je opažen znatno smanjen libido. Stanje je bilo toliko alarmantno da je bila potrebna intervencija stručne službe izvan ergele. Kad se zob uklonila iz obroka svi su simptomi nestali za otprilike 15 dana, kad su se životinje počele vraćati i u kondiciji.

Da se utvrdi uloga i značenje izolata *Alternariae* u ovoj intoksikaciji postupili smo po metodi Doupnika i Sobersa (1968): 1.000 grama zdravog kukuruza smo autoklavirali i inokulirali izolatima *Alternariae tenuis* sa zobi, ostavili 15 dana u mračnoj prostoriji kod temperature od 15°C i dnevno tresli sadržaj posuda. Nakon 15 dana smo crno-smeđu masu inokuliranog kukuruza osušili na temperaturi od 50°C kroz 15 sati i samljeli, pomiješali sa kukuruznim brašnom odličnog kvaliteta u odnosu 1:3 i dali kao hranu 5 dana starim pilićima i bijelim miševima. U pokusu je bilo 20 pilića i 6 bijelih miševa.

Drugi dio kukuruza koji je na isti način bio inokuliran i držan, ekstrahiran je 2% nim metanolom u kloroformu i nakon toga evaporacijom u vo-

denoj kupki (50°C) koncentrisan dok nije dobivena uljasta tekućina, koja je aplicirana 3 bijelim miševima intubacijom direktno u želudac u dozi od 0,25 ml u 50% DMSO po životinji. Odnosi ekstrakta prema volumenu metanola u kloroformu bili su: 5 ml ekstrakta od 500 ml metanola u kloroformu.

REZULTATI PATOMORFOLOŠKE I HISTOSKOPSKE PRETRAGE

Svi su pilići uginuli nakon 3 dana pod znakovima teškog gastroenteritisa i kaheksije. Kod obdukcije tkiva koja su bila fiksirana u 10% formalinu i obojena hematoksilinom i Sudan III, utvrđeno je u pilića:

Svježa kataralna upala sluznice tankog crijeva, nešto izrazitiji hepatitis lymphocytaria i plasmocytaria focalis. U preparatima obojenim Sudan III mast se mogla naći samo u neznatnim količinama. Na epikardu juvenilnog miokarda nađene su upalne stanice. Utvrđen je *nephritis lymphocytaria et plasmocytaria*, a jezgre epitelnih stanica tubula pokazivale su znakove degeneracija, pretežno karioreksu.

Miševi, hranjeni kontaminiranim kukuruzom uginuli su petog dana od početka hranjenja, a oni koji su ekstrakt kulture dobili intubacijom nakon 3 dana od aplikacije. Mikroskopski nalazi u organima miševa manifestirali su se redovito svježom kataralnom upalom gastrointestinalnog trakta različita stupnja. U jetri je utvrđena redovito proteino- i lipohepatoza, koja je bila anaboličke prirode (sa marginalnom hiperkromatozom staničnih jezgara intumescenčnih hepatocita). U jednom dijelu slučajeva bila je kombinovana sa seroznom upalom, u drugom opet sa fokalno diseminiranom agregacijom limfoidnih stanica. U miokardu je redovno bila blaga Zenkerova distrofija. U većini slučajeva utvrđena je proteinonefroza, uključujući i hijalinokapljicasti oblik skoro uvijek zajedno sa liponefrozom i pojedinačnom jačom hiperemijom glomerula, kao i nakupljanjem limfocita i plazmocita u intersticiju. U slezeni je utvrđena hiperemija, ekstravazati i hijalinoza krvnih žila, samo jednom i septički tumor slezene. U moždinama je u većini slučajeva utvrđena hiperemija i edem, samo jednom fokalna, limfoidocitarna ekstravaskularna upala moždana.

U pokušaju da se utvrde odgovorni metaboliti, odnosno toksini koji su odgovorni za te promjene, iz kulture alternarije, koja je rasla 15 dana na kukuruzu napravljen je etanolni ekstrakt i podvrgnut postupku tankoslojne kromatografije, kao što to opisuje Meronuck sa saradnicima (1972). U ultraljubičastom svijetlu, pokazivao je ekstrakt slabu reakciju, a kod prskanja feri-kloridom u etanolu ta mrlja je bila tamno crvena, što je karakteristika tenuazonske kiseline.

DISKUSIJA

Čini se, da je ovim pokusima dokazano, kako su se izolati sa pljesnive zobi pokazali toksični i u patološko-anatomskim manifestacijama veoma bliski, ako ne i identični onim koje su opisali Doupnik i Sobers (1968). U našim pokusima nismo opazili ni jedan slučaj krvarenja u gastrointeksti-

nalnom traktu, kako su opazili Forgacs i saradnici (1959. i 1962) i Doupnik i Sobers (1968) ali su zato hepatotoksički i nefrotoksički efekti i manifestacije bili jako istaknuti.

Treba napomenuti, da Alternarija nije tako rijedak izolat sa žitarica. Christensen i Kaufmann (1969) su dokazali, da je od njihovih izolata alternarija čak 90% bilo toksično u pokusu na životinjama. Frekvencija alternarije sa raznih žitarica u našem materijalu (Ožegović-Hlubna, 1977, u tisku) iznosila je na kukuruzu 31,45%, pšenici 18,08%, grahu 31%, riži 26,5% i na zobi 21,9%. Međutim u pojedinim dijelovima uzoraka i u pojedinim uzorcima, posebno graha, naišli smo i na infestaciju od 100%, što sigurno nije bez značenja kod uživanja takvih namirnica,

Kao mogući toksini alternarija spominju se: alternariol, alternariol-monometil-eter, alternuen, altertoksin I, altertoksin II i tenuazonska kiselina i svi se dadu kromatografski dokazati i odvojiti (Pero i saradnici, 1973). Ipak, čini se da najveće značenje treba dati tenuazonskoj kiselini (Merounuck i saradnici 1972), jer su toksične doze za ostale toksine prevelike. Prema Gittermanu (cit. Pero i sar., 1973) LD₅₀ za miša je 81 mg/kg, dok za ostale toksine Pero i sar. (1973) daju slijedeće podatke na osnovu vlastitih istraživanja: alternariol i alternariol monometil-eter 100—400 mg/kg, dok altertoksin I i II 200 mg/kg. Zanimljivo je da je doza za ženske životinje bila dvostruko veća od one za muške životinje. Na osnovu tako visokih doza koje su potrebne da u miševa i štakora izazovu trovanje, Merounuck i saradnici (1972) sumnjaju da bi tenuazonska kiselina mogla predstavljati veći mikotoksikološki problem. Međutim, dokazana je toksičnost svih izolata alternarije na He-La stanice, na Bacillus mucoides, a teratoidni efekat tenuazonske kiseline je od posebna značenja (Pero i sar., 1973). U pokusima Peroa i saradnika (1973) kombinacija od alternariola i alternariola-monometil-etera u dozi od 25 mg/kg od svakog toksina davala je povećani postotak smrtnosti i rezorbovanih fetusa. Kad je dan sam alternariol u dozi od 100 mg/kg, povećao se postotak malformiranih fetusa, što zajedno sa utvrđenim sinergizmom spomenutih toksina može imati značenja u patologiji onih koji kroz dulji period uživaju namirnice u kojima ima toksina alternarije.

Čini se, da upravo taj momenat, uzimanje manjih doza toksina koji djeluju sinergistički i kroz dulji period može dovesti do trovanja koja se ni izdaleka ne daju naslutiti u akutnom trovanju, pa mogu biti od značenja i za ljude i za životinje, koje troše takvim toksinima zagađene namirnice. Joffe (1960) je vjerojatno mislio na takav sinergizam kod alimentarne toksičke aleukije (ATA), iako je Sarkisov (1952) dokazao prije Szathmariya, Mirochae i Palysika (1975), da je kod ATA dovoljan i sam toksin Fus. tricinctuma (sporotrichiella) koji stvara veoma toksični 12, 13-epoksitriklotekan. Kako je dokazana interkacija i sinergizam i ostalih toksina, ne bi trebalo ni tu mogućnost ispustiti iz vida, kod tumačenja toksičnosti alternarije.

Na kraju, treba spomenuti, da su Seitz i saradnici (1975) utvrdili pozitivnu korelaciju između prisutnosti alternariol-monometil-etera i alternariola i kišnih dana u SAD, te faktora uskladištenja zrnja. Od velikog je značenja da se prisutnost tih toksina alternarije mogla utvrditi u prirodi u uslovima kišnih godina i kasnih jeseni kad su vlaga samog zrnja i uslovi uskla-

dištenja djelovali kao pogodujuć moment za invaziju zrnja. U našim slučajevima trovanja pljesnivom zobi isti su faktori bili prisutni: obilate kiše i loši uslovi uskladištenja, što je promijenilo i vanjski izgled zobi, koju je alternarija žestoko invadirala.

ZAKLJUČAK

1. Opisana intoksinacija pljesnivom zobi dokazana je kao trovanje toksinima *Alternariae tenuis*, koja je izolirana sa pljesnive zobi.

2. Ekstrakti kultura *Alternariae tenuis* dokazani su kao toksički na pokusnim životinjama, na kojima je bila reproducirana bolest.

3. U ekstraktima je kromatografski dokazana tenuazonska kiselina za koju se vjeruje da bi mogla biti glavni krivac trovanja, ali se ne može isključiti i druge toksine, koji djeluju sinergistički.

4. S obzirom na veliku frekvenciju *Alternariae* na namirnicama ne bi a priori trebalo odbaciti mogućnosti toksičkog djelovanja toksina alternarije, posebno kroz dulji period i u interakciji sa drugim mikotoksinima.

OŽEGOVIĆ, L., DŽUVIĆ, A. und MATUKA, O.

TOXISCHE WIRKUNGEN BEI DEN ARTEN *ALTERNARIAE TENUIS*, ISOLIERT VON SCHIMMELIGEM HAFER

ZUSAMMENFASSUNG

Die beschriebene Intoxikation durch schimmeligen Hafer wurde als Vergiftung mit den Toxinen *Alternariae tenuis* angegeben, die von schimmeligen Hafer isoliert sind.

Die Extrakte der Kultur *Alternariae tenuis* sind als toxische an den Versuchstieren festgestellt, an denen die Krankheit reproduziert worden ist.

In den Extrakten wurde chromatographisch die tenuasonische Säure festgestellt, die man als mögliche Hauptursache der Vergiftung betrachtet, wobei jedoch auch andere Toxine nicht auszuschliessen sind, die sinergistisch wirken.

In Anbetracht der grossen Frequenz von *Alternariae tenuis* beim Füttern sollte man nicht von vorneherein die Möglichkeit einer toxischen Wirkung des Toxins *Alternaria*, besonders während einer längeren Periode und in Interaktion mit anderen Mikotoxinen, ausschliessen.



LITERATURA

- Christensen, C. M. (1951): *Fungi on and in wheat seeds*. Cereal Chem. 28:408—415.
- Christensen, C. M. (1965): *Fungi, cereal grains and their products* In: *Mycotoxins in foodstuffs*, G. N. Wogan edit., pp 9—14, M. I. T. Press, Cambridge, Mass.
- Christensen, C. M. and Kaufmann, H. H. (1969): *Grain storage. The role of fungi in quality loss*, Univ. Minnesota Press 1969.
- Doupnik, B. and Sobers, E. K. (1968): *Mycotoxicosis: Toxicity to chicks of Alternaria longipes isolated from tobacco*. Appl. Microb. Vol. 16, 10, 1956—1957.
- Forgacs, J., Koch, H., Carll, W. T. and White-Stevens, R. H. (1958): *Additional studies on the relationship of mycotoxicoses to the poultry haemorrhagic syndrome*. Am. J. Vet. Res. 19, 744—753.
- Forgacs, J., Koch, H., Carll, W. T. and White-Stevens, R. H. (1962): *Mycotoxicoses I. Relationship of toxic fungi to mouldy-feed toxicosis in poultry*. Avian Dis. VI, 3, 363—397.
- Forgacs, J. and Carl, W. T. (1962): *Mycotoxicoses*, Adv. Vet. Sci. 7, 272—373.
- Joffe, A. Z. (1960): *The mycoflora of overwintered cereals and its toxicity*. Bull. Res. Council, Israel, Sect. D. 9:101—126.
- Meronuck, R. S., Steele, J. A., Mirocha, C. J. and Christensen, C. M. (1972): *Tenuazonic acid, a toxin produced by Alternaria alternata*. Appl. microb. Vol. 23, 3, 613—617.
- Pero, R. W., Posner, H., Blois, M., Harvan, D. and Spalding, J. W. (1973): *Toxicity of metabolites produced by »Alternaria«*. Enver Health Persp., exp. issue N°. 87—94.
- Ožegović, L. i Hlubna, D. (1977): *Plijesni sa žitarica (u tisku)*.
- Sarkisov, H. H. (1952): *Mikotoksikozi domaćih životnih*, Kolos Moskva.
- Seitz, L. M., Sauer, D. B., Mohr, H. E. and Burroughs, R. (1975): *Weathered grain sorghum: natural occurrence of Alternariols and storability of the grain*. Phytopathology, 65, 11, 1259—1263.
- Slifkin Miriam, K. and Spalding Judson (1970): *Studies of the toxicity of Alternaria mali*. Toxicol. appl. Pharmacol. 17, 375—386.
- Szathmary, C., Mirocha, C. J. and Palyusik, M. (1975): *Identification of mycotoxins by species of Fusarium and Stachybotrys obtained from East Europe*. Excerpt from Washington Conference on Mycotoxins, oktobar 1975.