

Meldrøyekontroll av fôrkorn -*Claviceps purpurea* og ergotalkaloider

Trude Vrålstad

Silvio Uhlig

Elin Rolén

Aksel Bernhoft





Veterinærinstituttets rapportserie · 6 - 2013

Tittel

Meldrøyekontroll av fôrkorn
-*Claviceps purpurea* og ergotalkaloider

Publisert av

Veterinærinstituttet · Pb. 750 Sentrum · 0106 Oslo

Form: Graf AS
Veterinærinstituttet

Forsidebilde: Meldrøyesclerotier fra bygg.
Foto: Berit Tønnesen

Bestilling

kommunikasjon@vetinst.no
Tel: 23 21 63 66

ISSN 1890-3290 elektronisk utgave

Forslag til sitering:

Vrålstad T, Uhlig S, Rolén E, Bernhoft A. Meldrøyekontroll av fôrkorn -*Claviceps purpurea* og ergotalkaloider. Veterinærinstituttets rapportserie 6-2013. Oslo: Veterinærinstituttet; 2013.

© Veterinærinstituttet
Kopiering tillatt når kilde gjengis



Veterinærinstituttets rapportserie

— Norwegian Veterinary Institute Report Series

Rapport 6 · 2013

Meldrøyekontroll av fôrkorn -*Claviceps purpurea* og ergotalkaloider

Forfattere

Trude Vrålstad

Silvio Uhlig

Elin Rolén

Aksel Bernhoft

11. mars 2013

ISSN 1890-3290 elektronisk utgave



Veterinærinstituttet
— Norwegian Veterinary Institute

Bakgrunn og formål

EU-Kommisjonen anbefaler at det kontrolleres og kartlegges for meldrøye i korn. Formålet med dette er blant annet å fremskaffe flere analyseresultater som grunnlag for å vurdere bakgrunnsverdier og eventuelle endrede grenseverdier. Nåværende grenseverdi er 1000 mg/kg korn (0,1 vekt % sklerotier av meldrøye = *Claviceps purpurea*).

Mattilsynet utarbeidet derfor en prøvetakingsplan for uttak av kornprøver for å kartlegge forekomst av meldrøye i korn (fôr) høstet i 2012. Formålet med planen var å kartlegge forekomst av meldrøye og dens toksiner (ergotalkaloider) i rug/rughvete/triticale, hvete og bygg i tråd med EU-Kommisjons anbefaling 2012/154/EU om kontroll med forekomst av ergotalkaloider i fôr og næringsmidler. Ved overskridelse av grenseverdier for meldrøye på 1000 mg/kg i et sporbart parti kan det være aktuelt å iverksette tiltak.

Prøvene ble sendt Veterinærinstituttet for analyse, og Veterinærinstituttet har på oppdrag fra Mattilsynet analysert 36 prøver av norskprodusert korn. Prøvene ble innsendt fra ulike distriktskontor i løpet av høsten 2012 (jfr. tabell 1).

Metoder

ME02_154 "Meldrøye – kvantifisering".

Metoden beregner vekt % av meldøye sklerotier per kg korn i tråd med EFSAS anbefaling. A-prøve og B-prøve ble undersøkt separat. Begge prøver ble veiet, deretter spredt utover en stor lys flate for visuell inspeksjon (Figur 1). Påviste sklerotier av meldøye ble plukket ut og veiet separat for vekt % beregning.



Figur 1. Kornprøve av rug (A) og bygg (B) med meldrøyesklerotier (hvite piler).
Foto: Elin Rolén (A) og Berit Tønnesen (B), Veterinærinstituttet.

Analysens usikkerhet: Det er alltid usikkerhet forbundet med visuell inspeksjon, først og fremst i forhold til risiko for underestimering. Imidlertid er sklerotiene svarte, karakteristiske og større enn kornene. Nøye gjennomgang skal derfor fange alt.

Alle sklerotier ble plukket ut og vurdert av ekspertise for morfologisk verifisering. I tillegg ble et utvalg representative sklerotier for hver kornsort analysert molekylært for artsverifisering (= identifisering av *Claviceps purpurea*) ved hjelp av DNA sekvensering. Vi vurderer derfor resultatene som presise, uten risiko for overestimering og med minimal risiko for underestimering.

ME05_193 "Ergotalkaloider - semikvantitativ bestemmelse med LC-MS/MS".

Metoden påviser og kvantifiserer de seks ergotalkaloidene som ifølge EFSA anses som de viktigste og hyppigst forekommende: ergometrin, ergotamin, ergosin, ergocristin, ergocryptin (α - og β -isomere) og ergocornin, samt deres epimerformer (se ytterligere bakgrunnsinformasjon under).

Sklerotiene ble lagt tilbake i samleprøvene (A- og B- separat). A-prøven ble kvernet og 10 g homogenisert prøve tatt ut for videre analyse. Metoden bestod kun av et ekstraksjonstrinn med etterfølgende LC-MS/MS analyse. Denne tilnærmingen uten opprensing av ekstraktet innebærer vanligvis en del matrikseffekter (gjærne opp til 20 %), men siden Veterinærinstituttet per i dag ikke rutinemessig utfører kvantitative analyser på ergotalkaloider har vi ikke en validert metode gående. Resultatene må derfor betraktes som semikvantitative.

Valgte metode ble ansett som en tidsbesparende tilnærming som gjorde at vi kunne levere semikvantitative resultater egnet for formålet på relativt kort varsel. Det finnes et sertifisert referansemateriale for ergotalkaloider på markedet, men dette har vi foreløpig ikke rukket å teste.

Resultater

Fem av prøvene overskrider EUs grenseverdi (1000 mg/kg korn = 0,1 %) for A-prøven. Dette gjelder prøvene merket 08841 (rug; 0,14%), 09867 (rug; 0,23%), 04304 (rug; 0,11%), 04305 (rug; 0,16%), og 01806 (rug; 1,33%). Dette gjentok seg i tre av de respektive B-prøvene: 09867 (rug; 0,17%), 04305 (rug; 0,13%), og 01806 (rug; 1,36%), se tabell 1. De resterende to B-prøvene (08841 og 04304) ligger rett under 0,1 %. Til sammenligning er også grenseverdier for Australia (=0,05%) og USA/Canada (= 0,03%) angitt og markert tabell 1. Syv av prøvene overskrider grenseverdiene for Australia og USA/Canada (fremdeles kun prøver av rug), mens meldrøye ble påvist under laveste grenseverdi (<0,03 %) i ytterligere seks A-prøver og ti B-prøver (bygg, hvete og rug). Molekylære undersøkelser bekreftet at undersøkte sklerotier fra alle kornslag var 100% identiske med ITS-sekvenser av *Claviceps purpurea*. ITS-sekvenser benyttes til "barcoding" (artsidentifisering) av sopp, og skiller også på genotyper. Vi påviste to ulike *C. purpurea* genotyper (G1 og G2), hvor G1 ble påvist både for rug, hvete og bygg, mens G2 ble påvist for rug og hvete.

Det ble påvist en rekke ergotalkaloider i prøvene, også i noen prøver hvor det ikke ble påvist sklerotier (tabell 2). Det finnes ingen angitte grenseverdier i EU for ergotalkaloider, mens Canada og Uruguay har en grenseverdi på henholdsvis 3 mg/kg og 0,45 mg/kg i korn brukt til dyrefôr. Ingen av tallene i det undersøkte materialet overskrider grenseverdiene for Canada, men overskrider Uruguays grenseverdi i to prøver: prøve merket 09867 (rug; 0,47 mg/kg av total ergotalkaloider), og prøve merket 01806 (rug; 1,6 mg/kg av total ergotalkaloider). Disse prøvene inneholdt også flest sklerotier (henholdsvis 0,23 % og 1,33%). For øvrige prøver ble det kun påvist lavere konsentrasjoner godt under Uruguays grenseverdi.

Vurdering

I Europa er soppen *Claviceps purpurea* (vanlig meldrøye) den dominerende arten av *Claviceps*. Det er kjent at *C. purpurea* kan infisere mer enn 400 plantearter, inkludert kornarter som rug, hvete, bygg og havre, hvorav rug er mest utsatt. Den infiserer dermed også en rekke grasarter som er vanlig kantvegetasjon langs kornåkre (Figur 2).



Figur 2. Meldrøye (*Claviceps purpurea*) infiserer en rekke arter av gras som er vanlig kantvegetasjon rundt kornåkre, for eksempel hundegras (*Dactylis glomerata*; A), engsvingel (*Festuca pratensis*, B), timotei (*Pleum pratense*; C) og kveke (*Elytrigia repens*; D). Meldrøyesklerotier (hvite piler). Foto: Trude Vrålstad, Veterinærinstituttet.

Soppen produserer og akkumulerer en rekke toksiner i sklerotiene (= infiserte korn omdannet til soppens overlevelsesorgan). Den største og viktigste gruppen av meldrøyetoksiner refereres til som ergotalkaloider.

Resultatene indikerer at meldrøye kan være et større problem i norsk korn enn hittil antatt. Imidlertid er det kun prøver av rug som overskrider EUs grenseverdi for vekt% sklerotier. Etter det vi kjenner til er rug lite benyttet i dyrefôr.

Mengdene med ergotalkaloider tilsvarende det som ble påvist i prøvene fra denne relativt begrensede pilotundersøkelsen, vil dermed antakelig utgjøre svært liten risiko for husdyr. Imidlertid kan mennesker som spiser mye rug kunne komme over TDI (tolerabelt daglig inntak) ved inntak av tilsvarende mengder som ble påvist i undersøkte rugprøver

Ytterligere bakgrunnsinformasjon

Produktene av ergotalkaloid-biosyntesen er ergopeptiner som vanligvis utgjør den største andelen av ergotalkaloider i sklerotier av meldrøye. En rekke forskjellige analoger har blitt beskrevet i litteraturen, men det er seks analoger som anses som de viktigste, og som også EFSA har konkludert med skal inngå i kjemisk analyse av ergotalkaloider: ergometrin, ergotamin, ergosin, ergocristin, ergocryptin (α - og β -isomere) og ergocornin, samt deres epimerformer som er regnet som inaktive, men som kan lett omdannes til de aktive epimerene. Alle disse inngikk i den semikvantitative LC-MS/MS metoden som Veterinærinstituttet benyttet, og flere av disse toksinene ble også funnet (tabell 2).

Vi kan bekrefte at de seks ergotalkaloidene (og da særlig ergocristin, ergocryptin og ergosin) er oftest hovedalkaloidene i de meldrøyesklerotiene fra Norge som vi har studert i de siste årene. Men det finnes unntak. Alle sklerotier inneholder noen prosent ergopeptamer (laktam analoger som er resultatet av en epimerisering av aminosyren prolin under biosyntesen). Det finnes tilfeller der disse er de dominerende analogene (Uhlig & Petersen, 2008), men en har hittil aldri undersøkt deres forekomst i korn. Vi har også upubliserte data som viser at en av gentypene til meldrøye (G2, som ble påvist i det undersøkte materiale både for rug og hvete) ser ut til å kunne produsere såkalte indol-diterpener. Noen forbindelser i denne substansgruppen er kjent til å kunne gi tremorgene forgiftninger, men bioaktiviteten til analogene som vi har funnet har ikke blitt undersøkt.

Basert på LD50-verdier viser ergotalkaloider moderat oral akutt toksisitet. Subletal akutt eksponering gir nevrotoksisitet, inkludert uro, endret pupillstørrelse, kraftløshet, skjelving og stive bevegelser. Ved gjentatt eksponering gir ulike ergotalkaloider hemmet blodsirkulasjon (vasokonstriksjon) - især i ekstremitetene, redusert kroppsvekt, samt diverse hormonelle effekter som bl.a. gir seg utslag i reproduksjonseffekter som hemmet implantasjon, embryotoksisitet og hemmet laktasjon. Studier fra rotte indikerer at det ikke er store kvantitative forskjeller i toksisitet mellom undersøkte toksiner (ergotamin, ergometrin og α - ergocryptin) med ikke-observert-skadelig-effekt-nivå (NOAEL) på 220-600 $\mu\text{g/kg}$ kroppsvekt per dag. Vasokonstriksjon i halen er funnet å være kritisk effekt hos rotte, med beregnet Benchmark dosenivå (BMDL10) på 330 $\mu\text{g/kg}$ kroppsvekt per dag for ergotamin. Fra denne har EFSA beregnet en human akutt referansedose (ARfD) på 1 $\mu\text{g/kg}$ kroppsvekt per dag og en TDI på 0,6 $\mu\text{g/kg}$ kroppsvekt per dag. Da det ikke er påvist store forskjeller i potens mellom undersøkte ergotalkaloider, regnes ARfD og TDI for summen av de påviste toksinene.

Denne undersøkelsen bekrefter at meldrøye og ergotalkaloider først og fremst ser ut til å forekomme i rug. Rug brukes minimalt i dyrefôr, og derfor begrenses problemet knyttet til disse toksinene via kornbasert fôr. Effektdata for husdyr er noe mangelfullt. Hos okser har man ikke funnet effekter ved ca 9 $\mu\text{g/kg}$ kroppsvekt per dag av totalalkaloider, og heller ikke hos kalver ved ca 30 $\mu\text{g/kg}$ kroppsvekt per dag. Hos grisunger er vist kritisk effekt (redusert fôr-inntak) ved totalalkaloider i området 3,6-11 mg/kg fôr. Herav er avledet NOAEL på 150-260 $\mu\text{g/kg}$ kroppsvekt per dag. For kyllinger er vist betennelse i tarmen ved 2,8 mg/kg fôr og høyere, mens eldre fjørfe er antatt å være mindre sensitive.

Referanser

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on Ergot alkaloids in food and feed. EFSA Journal 2012;10(7): 2798, 158 p.

Uhlig, S.; Petersen, D (2008) Lactam ergot alkaloids (ergopeptams) as predominant alkaloids in sclerotia of *Claviceps purpurea* from Norwegian wild grasses, Toxicon, 52, 175-185.

Tabell 1. Meldrøye-kontroll av konvensjonelt korn innsendt av Mattilsynet høsten 2012.

Rekvirent	Inspektør	Mattilsynets referanse	Saksnr. 2012-23-	Mottatt dato	Kornslag	Morfologisk undersøkelse, vekt%		Toksinanalyse*
						A-prøver	B-prøver	Σ Ergopeptines (ug/kg)
1 Ytre Østfold	A. Lysaker	08840	255-1	19/10	bygg	ikke påvist	ikke påvist	11,6
2	"	08841	255-2	"	rug	0,14%	0,08%	257,7
3	"	08842	255-3	"	hvete	ikke påvist	ikke påvist	21,9
4	"	08843	255-4	"	rug	0,09%	0,09%	98,0
5	"	04044	256	"	hvete	ikke påvist	<0,01%	94,9
6	"	09867	257	"	rug	0,23%	0,17%	472,2
7 Indre Østfold og Follo	K.A.B. Sandberg	02185	238	26/9	hvete	ikke påvist	<0,01%	0,0
8		02188	247	9/10	hvete	<0,01%	ikke påvist	80,8
9 Vestfold	K. Torkveen	04300	237	26/9	hvete	ikke påvist	ikke påvist	11,3
10	"	04304	249-1	11/10	rug	0,11%	0,06%	303,8
11	"	04305	249-2	"	rug	0,16%	0,13%	15,9
12	"	04306	249-3	"	hvete	<0,01%	<0,01%	28,3
13 Romerike	M. Bang	01803	235	26/9	hvete	ikke påvist	ikke påvist	0,0
14	"	01806	236	"	rug	1,33%	1,36%	1575,8
15	"	01807	239	28/9	bygg	ikke påvist	ikke påvist	12,5
16	"	05281	250	11/10	hvete	ikke påvist	<0,01%	0,0
17	"	05292	252	17/10	hvete	ikke påvist	ikke påvist	0,0
18 Hadeland og Ringerike	M. Tingbø	02784	206-1	21/9	hvete	ikke påvist	ikke påvist	10,2
19	"	02785	206-2	"	rug	<0,01%	0,01%	0,0
20	"	02786	207	"	bygg	ikke påvist	ikke påvist	0,0
21	"	05319	248-1	11/10	hvete	ikke påvist	ikke påvist	0,0
22	"	05320	248-2	"	rug	0,038%	0,035%	103,9
23 Hedmarken	J. Bye	05001	211	25/9	bygg	0,026%	0,027%	163,9
24 Gudbrandsdal	J. Bye	05004	245-1	4/10	hvete	<0,01%	<0,01%	22,2
25	"	05005	245-2	"	hvete	ikke påvist	<0,01%	0,0
26 Midt-Rogaland	H.T. Judi	03959	234	26/9	bygg	ikke påvist	<0,01%	0,0
27	"	02601	246	9/10	bygg	0,01%	0,027%	12,0
28	I. T. Nielsen	02615	290	16/11	bygg	ikke påvist	ikke påvist	0,0
29	"	02616	291	"	bygg	ikke påvist	ikke påvist	39,3
30 Sør-Innherred	A. Thomassen	03381	241	2/10	bygg	ikke påvist	ikke påvist	0,0
31	"	03374	242	"	bygg	ikke påvist	ikke påvist	11,2
32	"	03376	243-1	"	bygg	ikke påvist	ikke påvist	0,0
33	"	03379	243-2	"	hvete	ikke påvist	ikke påvist	0,0
34	"	03380	244	"	bygg	ikke påvist	ikke påvist	0,0
35	"	03385	259	22/10	bygg	ikke påvist	ikke påvist	18,4
36	"	03375	260	"	hvete	ikke påvist	ikke påvist	0,0

Kontinent	EU	Australia	USA/Canada	Påvist under laveste grenseverdi
Grenseverdi vekt% sklerotier	0,1	0,05	0,03	< 0,03

Kontinent	EU	Canada	Uruguay	Påvist under laveste grenseverdi
Grenseverdi toksininhold ug/kg	Ikke angitt	3000	450	< 450

Tabell 2. Detaljert oversikt over toksinanalyser (ergotalkaloider), Meldrøye kontroll 2012

Rekvirent	Mattilsynets referanse	Saksnr. 2012-23-	Kornslag	Lysergol (ppb)	Ergometrine (ppb)	Festuclovine (ppb)	Ergovaline (ppb)	Ergosine (ppb)	Ergotamine (ppb)	Ergocornine (ppb)	Ergocryptine (ppb)*	Ergocristine (ppb)	Σ Ergopeptines (ppb)
Ytre Østfold	08840	255-1	bygg	-	-	-	-	-	-	-	11,6	-	11,6
	08841	255-2	rug	-	23,0	-	-	46,1	38,7	27,9	71,3	50,8	257,7
	08842	255-3	hvete	-	-	-	-	-	10,6	-	11,3	-	21,9
	08843	255-4	rug	-	-	-	-	23,5	37,6	-	23,0	14,0	98,0
	04044	256	hvete	-	-	-	-	61,1	-	-	11,4	22,5	94,9
	09867	257	rug	-	14,7	-	8,9	63,5	131,9	70,3	149,4	33,5	472,2
Indre Østfold og Follo	02185	238	hvete	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
	02188	247	hvete	-	-	-	-	33,0	-	-	27,6	20,1	80,8
Vestfold	04300	237	hvete	-	-	-	-	-	-	-	11,3	-	11,3
	04304	249-1	rug	-	16,0	-	-	25,8	45,4	20,1	186,3	10,2	303,8
	04305	249-2	rug	-	-	-	-	-	-	-	15,9	-	15,9
	04306	249-3	hvete	-	-	-	-	10,2	-	-	-	18,1	28,3
Romerike	01803	235	hvete	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
	01806	236	rug	-	38,8	-	15,0	135,7	1034,9	59,9	231,9	59,5	1575,8
	01807	239	bygg	-	-	-	-	-	-	-	12,5	-	12,5
	05281	250	hvete	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
	05292	252	hvete	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
Hadeland og Ringerike	02784	206-1	hvete	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,2
	02785	206-2	rug	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
	02786	207-1	bygg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
	05319	248-1	hvete	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
Hedmarken	05320	248-2	rug	-	-	-	-	18,4	26,5	11,8	17,5	29,7	103,9
	05001	211-1	bygg	-	8,3	-	6,4	15,1	17,5	29,1	45,2	42,3	163,9
Gudbrandsdal	05004	245-1	hvete	-	-	-	-	10,8	-	-	-	11,4	22,2
	05005	245-2	hvete	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
Midt-Rogaland	03959	234	bygg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
	02601	246	bygg	-	-	-	-	-	-	-	12,0	-	12,0
	02615	290	bygg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
	02616	291	bygg	-	-	-	-	18,7	-	-	-	20,6	39,3
Sør-Innherred	03381	241	bygg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
	03374	242	bygg	-	-	-	-	-	-	-	11,2	-	11,2
	03376	243-1	bygg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
	03379	243-2	hvete	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
	03380	244	bygg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
	03385	259	bygg	-	-	-	-	-	-	-	-	18,4	18,4
	03375	260	hvete	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0

Kontinent	EU	Canada	Uruguay	Påvist under laveste grenseverdi
Grenseverdi toksininhold ug/kg	Ikke angitt	3000	450	< 450



Veterinærinstituttet er et nasjonalt forskningsinstitutt innen dyrehelse, fiskehelse, mattrygghet og dyrevelferd med uavhengig forvaltningsstøtte til departementer og myndigheter som primæroppgave. Beredskap, diagnostikk, overvåking, referansefunksjoner, rådgivning og risikovurderinger er de viktigste virksomhetsområdene.

Veterinærinstituttet har hovedlaboratorium i Oslo og regionale laboratorier i Sandnes, Bergen, Trondheim, Harstad og Tromsø, med til sammen ca. 360 ansatte.

www.vetinst.no

Tromsø

Stakkevollvn. 23 b · 9010 Tromsø
9010 Tromsø
t 77 61 92 30 · f 77 69 49 11
vitr@vetinst.no

Harstad

Havnegata 4 · 9404 Harstad
9480 Harstad
t 77 04 15 50 · f 77 04 15 51
vih@vetinst.no

Bergen

Bontelabo 8 b · 5003 Bergen
Pb 1263 Sentrum · 5811 Bergen
t 55 36 38 38 · f 55 32 18 80
post.vib@vetinst.no

Sandnes

Kyrkjev. 334 · 4325 Sandnes
Pb 295 · 4303 Sandnes
t 51 60 35 40 · f 51 60 35 41
vis@vetinst.no

Trondheim

Tungasletta 2 · 7047 Trondheim
7485 Trondheim
t 73 58 07 50 · f 73 58 07 88
[vit@vetinst.no](mailto:vitr@vetinst.no)

Oslo

Ullevålsveien 68 · 0454 Oslo
Pb 750 Semtrum · 0106 Oslo
t 23 21 60 00 · f 23 21 60 01
post@vetinst.no

