

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ МИКОТОКСИКОЗОВ У СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ.

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

**Modern methods for diagnostics of mycotoxicosis in farm animals.**

**Literature review**

**А. А. Неугодникова**, студент

**Н. Г. Курочкина**, кандидат ветеринарных наук, доцент

Уральский государственный аграрный университет

(Екатеринбург, ул. Карла Либкнехта, 42)

*Рецензент:* Т. В. Бурцева, кандидат педагогических наук, доцент

#### **Аннотация**

В данной статье рассматриваются наиболее изученные виды микотоксинов, общие клинические признаки, патологоанатомические признаки, комплексная диагностика и современные методы диагностики микотоксикозов у сельскохозяйственных животных.

**Ключевые слова:** микотоксины, сельскохозяйственные животные, комплексная диагностика, современные методы диагностики.

#### **Summary**

This article discusses the most studied types of mycotoxins, common clinical signs, general pathoanatomical signs, complex diagnostics and modern methods for diagnosing mycotoxicosis in farm animals.

**Keywords:** mycotoxins, farm animals, complex diagnostics, modern diagnostic methods.

В настоящий момент активно растёт интерес учёных к микотоксинам (вторичным метаболитам микроскопических плесневых грибов), которые встречаются в кормах сельскохозяйственных животных. Их опасность заключается в высоком уровне токсичности, кроме этого, они обладают способностью переходить в ткани, органы, а также биологические жидкости, тем самым разрушая организм животного.

Поедая корма, содержащие микотоксины, животные заболевают. В результате чего у них резко ухудшается оплодотворяемость, повышается риск аборт, рождения нежизнеспособного потомства и дистрофии тканей и органов.

Наиболее часто микотоксинами поражаются пшеница, кукуруза, подсолнечник, рожь, ячмень, рапс, силос, сенаж, комбикорма, зернофураж. Если же в организм животного в одно время поступило несколько разных микотоксинов, то уровень опасности повышается. А данный вариант наиболее вероятен, потому что современные рационы сельскохозяйственных животных разнообразны. Они могут содержать только микотоксины или микотоксины с другими токсичными химическими веществами и элементами. В результате возникает сочетанный эффект, который изменяет клинические признаки и в разы усложняет постановку диагноза и лечение [1].

Микотоксикозы имеют характерные признаки течения заболевания, которые и отличаю их от других заболеваний:

- Внезапное проявление;
- Массовость заражения;
- Короткий инкубационный период;
- Затухание болезни при смене кормов.

Грибы-возбудители микотоксикозов подразделяются на две группы:

1. Грибы-паразиты (поражающие растения).
2. Грибы-сапрофиты (размножающиеся на мёртвых тканях).

Также для развития грибов нужны определённые условия:

- Относительная влажность воздуха до 95%;
- Температура от +20<sup>0</sup> до +50<sup>0</sup> С;
- Влажность корма до 35%;
- Вид корма (на переработанных растениях повышается развитие грибов).

Наиболее изученные виды микотоксикозов:

1. Стахиботриотоксикоз.
2. Фузариотоксикоз.
3. Аспергиллотоксикоз.
4. Дендродохиотоксикоз.
5. Охратоксикоз.
6. Мукоротоксикоз.

Таблица 1

### Распространение микотоксинов в растительных продуктах [2]

Продуцент	Микотоксин	Поражает	Основной токсический эффект
Fusarium sporotrichioides F. poae	Т-2-токсин	Кукуруза, овес и продукты из него	Дерматотоксин
	НТ-2-токсин	Овес и продукты из него	
Fusarium graminearum	Дезоксиниваленол (ДОН) вомитоксина	Пшеница, кукуруза	Нейротоксин
Fusarium tricinctum	Трихотеценен	Кукуруза, арахис, рис	Нейротоксин
Fusarium moniliforme	Фумонизин В1 и другие фумонизины	Сорго, кукуруза	Нефротоксин, респираторные расстройства, нейротоксичность, вероятный канцероген
Aspergillus flavus Aspergillus parasiticus	Афлатоксин В1 В2 G1 G2	Арахис, кукуруза	Канцероген, гепатотоксин, мутаген и тератоген
Fusarium graminearum	Зеараленон	Кукуруза, овес	Вызывает нарушения генетического аппарата, мутаген
Penicillium citrinum	Цитринин	Ячмень, кукуруза, рис и грецкий орех	Нефротоксин, мутаген, вероятный канцероген
	Афлатоксин М1	Молоко и молочные продукты	Канцероген, гепатотоксин, мутаген и тератоген
Claviceps purpurea (moederkoren)	Алкалоиды спорыньи	Рожь, кормовые злаки	Нейротоксин

Penicillium islandicum	Лютеоскирин	Рис, сорго	Гепатотоксин, канцероген и мутаген
Aspergillus ochraceus Penicillium verrucosum	Охратоксин А	Овес, кофе, мясо, изюм	Нефротоксин и тератоген
Penicillium aurantiogriseum Penicillium fennelliae	Пенициллановая кислота	Фасоль, кукуруза	Нейротоксин
Aspergillus versicolor	Стеригматоцистин	Кукуруза, пшеница, кофе	Дерматотоксичен, тератоген, вероятный канцероген
Penicillium expansum en andere Penicillium species	Патулин	Яблоки и другие фрукты, фасоль, пшеница	Нейротоксин, вызывает нарушения генетического аппарата, вероятный канцероген, мутаген

В настоящее время известно порядка 400 микотоксинов. Из них наиболее распространёнными и опасными для животных и человека являются:

- Т-2 токсин;
- Афлатоксины;
- Охратоксин А;
- Дезоксиниваленол;
- Фумонизины.

Они достаточно устойчивы к воздействию окружающей среды, а также к термическим обработкам [14].

#### **Диагностика микотоксикозов**

В основном производится комплексная диагностика микотоксикозов. Она включает в себя: сбор анамнеза, учитываются клинические признаки и патологоанатомические изменения. Общие клинические признаки некоторых микотоксикозов:

Фукариотоксикозы: угнетённое состояние, чувствительность и аппетит снижены, нарушение перистальтики, мышечная дрожь, саливация, учащение сердечного ритма.

Аспергиллотоксикозы: угнетённое состояние, нарушение координации движения и перистальтики.

Охратоксикоз: угнетённое состояние, аппетит снижен, потеря массы тела.

Мукоротоксикоз: угнетённое состояние, поносы с кровью.

Дендродохиотоксикоз: угнетённое состояние, аппетит снижен, мышечная дрожь, отёчности.

Стахиботриотоксикоз: угнетённое состояние, некротические поражения губ, расстройство пищеварения, температура тела повышена.

Общие патологоанатомические изменения при некоторых микотоксикозах:

- Фукариотоксикозы: язвочки на слизистых оболочках;
- Аспергиллотоксикозы: дистрофия печени гиперемия слизистой оболочки бронхов;
- Охратоксикоз: жировая дистрофия печени, кровоизлияния;
- Мукоротоксикоз: бледность слизистых оболочек, тёмная печень;
- Дендродохиотоксикоз.: мелкие кровоизлияния в паренхиматозных органах, геморрагическое воспаление слизистой оболочки кишечника;
- Стахиботриотоксикоз: дистрофия печени, почек, миокарда, отёк лёгких и мозга.

Органолептическое исследование кормов производится в соответствии требованиям ГОСТов. Зачастую, корма, поражённые микотоксинами не имеют признаков порчи.

Микологический анализ - определение общего числа грибов в кормах, родовая и видовая идентификации грибов и определение токсичности выделенных изолятов. Если в кормах обнаруживается грибной налёт, то он соскабливается и проводится микроскопическое исследование. Также при поверхностном заражении можно применять метод смыва спор [3].

**Современные методы диагностики микотоксикозов и подготовка пробы.** Чтобы извлечь микотоксин из исследуемых объектов применяют жидкостно-жидкостную экстракцию. Наиболее часто применяется смесь ацетонитрила и воды в отношении 86:14. Для того, чтобы очистить анализируемые объекты от белков, жиров, липидов и прочих соэкстрагируемых веществ используют твердофазную экстракцию и иммуноаффинные колонки для избирательного извлечения микотоксинов.

#### 1. Хроматографические методы.

а. Газожидкостная хроматография. Данный метод заключается в пропускании определяемых веществ через специальную колонку при помощи газа, который является подвижной фазой (газ-носитель), выступая в роли переносчика вещества. А неподвижной фазой является жидкость, которая нанесена тонким слоем на твёрдый носитель. Основным методом распределительный, который основан на разной растворимости веществ в плёнке этой жидкости.

Достоинства: разделительная способность очень высокая; идентификация многокомпонентный смесей; универсальность; высокая чувствительность; изучение различных свойств веществ; выделение чистых культур.

Недостатки: сложность выполнения; длительность; дороговизна [4, 13].

б. Масс-спектрометрия. Метод основан на разрушении органической молекулы в результате ионизации различными способами. Образованные ионы сортируются полученным величинам отношения масса/заряд. После этого, каждое значение регистрируется в виде спектра. В настоящее время масс-спектрометры объединяют с газовым или жидкостным хроматографом для обеспечения большей специфичности. Метод применяется для характеристики, идентификации и подтверждения наличия микотоксинов. Недостаток – предварительные химические преобразования соединений, подвергающихся анализу, занимающие большое количество времени [5, 13].

с. Высокоэффективная жидкостная хроматография. В данном методе подвижная фаза представлена жидкостью (смесь метанола/ацетонитрила и воды), которая движется через хроматографическую колонку, заполненной сорбентом (неподвижной фазой). Используют различные механизмы разделения веществ: ионообменный, адсорбционный, распределительный, хиральный и др. Недостаток – сложности при подготовке проб [6, 13].

д. Тонкослойная хроматография. Данный метод заключается в разделении смеси веществ в неподвижной фазе – тонком слое сорбента. Применяется для обнаружения, количественного определения и идентификации микотоксинов.

Достоинства: доступность оборудования; простота методики; экономичность; высокая селективность; высокая чувствительность [7, 13].

#### 2. Иммунохимические методы.

а. Иммуноферментный анализ. Данный метод основан на высокой специфичности реакции антигена с соответствующем ему антителом и с последующим образованием иммунного комплекса. В результате чего образуется окрашенный продукт. Для данного анализа используются микропланшеты на 96 или 384 ячейки. На данный момент широкое применение обрели коммерческие тест-наборы для контроля за содержанием наиболее распространённых ми-

котоксинов. Кроме этого, ведутся активные разработки сенсорных устройств, с помощью которых станет возможным проведение тестирования в полевых условиях. А также изобретены и уже активно используются в лабораториях экспресс-тесты.

Недостатки: для анализа необходима экстракция органическими смесями, разбавленными до минимальных значений, что ухудшает чувствительность самого анализа; длительность [8, 9, 13].

в. Иммунофильтрация. Для данного метода характерно использование в роли твёрдой фазы (носителя) геля с иммобилизованными антителами. Анализ проводят в колонке для твердофазной экстракции, что позволяет включить дополнительный очищающий слой. Сам же гель служит для определения, выделения и концентрирования микотоксинов [10, 13].

с. Иммунохроматография. Данный одностадийный метод относится к реакциям с мечеными антителами, а именно используют частицы коллоидного золота. Анализ не требует реагентов и аппаратуры, необходимо просто погрузить тест-полоски (стрип-полоски) до отмеченного уровня в исследуемый образец. Сами полоски состоят из пористого адсорбента и мембраны-носителя. Анализируемый раствор в данном случае является подвижной фазой. Недостаток – не количественный метод, используется для предварительного скрининга, который доказывает превышение концентрации микотоксинов [11, 13].

д. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ. Для данного метода характерно использование флуоресцентных меток (молекулы флуоресцеина), которые ковалентно связаны с антигеном, образуя иммунокомплекс. Метод не требует разделения анализируемого вещества и иммунокомплекса. Недостаток – матрикс влияет на регистрируемый сигнал [12, 13].

Все иммунохимические методы сейчас активно внедряют и разрабатывают благодаря их:

- дешевизне;
- высокой специфичности и чувствительности;
- портативности;
- возможности обнаружения микотоксинов на предприятиях.

А для получения антител в настоящее время разработаны процедуры иммунизации животных, а также получения и тестирования моноклональных (наиболее применяемые благодаря их специфичности и чувствительности) и поликлональные (получают при помощи иммунизации кроликов) [13].

Таким образом, универсального метода для диагностики микотоксикозов у сельскохозяйственных животных на данный момент нет. Но, благодаря простоте, относительной скорости проведения, высокой чувствительности и дешевизне, наибольшую популярность в использовании приобрели иммунохимические методы, а именно иммуноферментный анализ, поэтому ведётся активная разработка экспресс-методик, а также активное их применение в лабораториях. Также иммунохимические методы отлично подходят для первичного скрининга партий корма для сельскохозяйственных животных, потому что имеют невысокую стоимость и простоту проведения метода.

### Библиографический список

1. Великанов В. В., Курдеко А. П. Диагностика и профилактика кормовых микотоксикозов у молодняка свиней [Электронный ресурс] // Научная электронная библиотека Elibrary.ru. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=32729181> (дата обращения: 10.02.2023).

2. *Петрова О. Г., Дроздова Л. И., Алексеев А. Д., Курочкина Н. Г., Муминов А. А.* Краткий курс лекций по общей и частной эпизоотологии, микотоксикологии с патологоанатомическим диагнозом [Электронный ресурс] // Научная электронная библиотека Elibrary.ru. Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=48053749> (дата обращения: 10.02.2023).
3. Микроскопическое исследование кормов [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://studfile.net/preview/5709793/page:71/> (дата обращения: 10.02.2023).
4. Газовая (газожидкостная) хроматография [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://studref.com/587735/tehnika/gazovaya\\_gazozhidkostnaya\\_hromatografiya](https://studref.com/587735/tehnika/gazovaya_gazozhidkostnaya_hromatografiya) (дата обращения: 10.02.2023).
5. Масс-спектрометрия [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://studfile.net/preview/2037923/> (дата обращения: 10.02.2023).
6. Высокоэффективная жидкостная хроматография [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://studfile.net/preview/2031402/page:5/> (дата обращения: 13.02.2023).
7. Тонкослойная хроматография [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://studref.com/587738/tehnika/tonkosloynaya\\_hromatografiya](https://studref.com/587738/tehnika/tonkosloynaya_hromatografiya) (дата обращения: 13.02.2023).
8. *Дубровин М. Ю., Кытманов А. А., Бакулина Л. В., Воробьев К. А., Дармов И. В.* Способ иммуноферментного обнаружения микотоксина Т-2 в жидких пробах [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://yandex.ru/patents/doc/RU2412443C1\\_20110220](https://yandex.ru/patents/doc/RU2412443C1_20110220) (дата обращения: 13.02.2023).
9. Иммуноферментный анализ [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://medach.pro/post/2047> (дата обращения: 14.02.2023).
10. *Жердев А. В., Гендриксон О. Д., Берлина А. Н., Зверева Е. А.* Экспрессные иммунохимические методы контроля токсичных контаминант в сельскохозяйственной продукции и продуктах питания [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.researchgate.net/publication/330142217\\_Immunohimiceskie\\_metody\\_analiza\\_Book\\_chapter\\_in\\_Russian](https://www.researchgate.net/publication/330142217_Immunohimiceskie_metody_analiza_Book_chapter_in_Russian) (дата обращения: 14.02.2023).
11. Иммунохроматографический анализ (ИХА) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://studfile.net/preview/3882419/page:10/> (дата обращения: 15.02.2023).
12. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://monographies.ru/en/book/section?id=9926> (дата обращения: 15.02.2023).
13. *Тринеева О. В.* Методы и перспективы определения микотоксинов в лекарственном растительном сырье (обзор) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://docviewer.yandex.ru/view/> (дата обращения: 17.02.2023).
14. *Буклагин Д. С.* Методы определения микотоксинов в сельскохозяйственной продукции и кормах [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/metody-opredeleniya-mikotoksinov-v-selskohozyaustvennoy-produktsii-i-kormah/viewer> (дата обращения: 17.02.2023).