

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 +20⁰ до +50⁰ 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 (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 (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 (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 (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).