



Эффективные способы выявления микотоксинов в сырье и готовых комбикормах

Т. Крюкова, ведущий технолог-консультант

О. Голубчикова, ведущий ветеринарный врач-консультант дивизиона птицеводства ГК ВИК

В настоящее время при динамичном развитии агропромышленного комплекса идет активное увеличение использования площадей сельскохозяйственных угодий в широком диапазоне климатических зон, с разными агротехническими мероприятиями и на фоне нарушения общего экологического равновесия.

Чтобы вырастить хороший урожай, необходимо комплексно защищать растения от сорняков, различных болезней и вредителей всевозможными специфическими препаратами. Но даже при выполнении всех агрозащитных мер, например против плесневых грибов, все равно диагностируется контаминация корма токсинами, и избежать этого практически невозможно.

Наиболее важными для сельского хозяйства микотоксинами являются трихотецены (Т-2 токсин, ДОН, ДАС), фумонизин, зеараленон, эрготоксин (в поле); афлатоксины, охратоксин А (в хранилище).

Микотоксины представляют собой структурно разнообразные вторичные метаболиты грибов, растущих на кормах, потребляемых животными и опосредованно попадающих в пищу человека, и могут сильно различаться по своему химическому составу и токсикологии [1].

При попадании мицелия гриба внутрь зерна, например при механическом повреждении, контактное действие противогрибкового препарата будет низкоэффективным, в дополнение плохие условия хранения будут способствовать росту грибов и выработке токсинов.

В процессе развития плесневые грибы постоянно эволюционно адаптируются и вырабатывают ряд токсичных и нетоксичных метаболитов. Токсичные метаболиты направлены на борьбу внутри микробной популяции, где они действуют непосредственно на конкурента. В настоящее время изучено более 400 видов токсичных метаболитов плесневых грибов — микотоксинов (и более 3500 видов не изучено) [2]. Все эти метаболиты вызывают токсикозы.

По причине постоянного изменения внешней среды, условий произрастания сельскохозяйственных культур и применения агрозащитных мер развитие

грибов осуществляется по пути биологического прогресса, обеспечивающего им успех в борьбе за существование [3]. В связи с этим и микотоксины видоизменяются, трансформируются и приобретают новые формы.

По мнению Бакулина В.А., при хранении кормов из нового урожая зерновых даже 2–3 недель достаточно для накопления микотоксинов в критичном для отравления птицы количестве. [4]. Необходимо отметить, что высокопродуктивные породы птицы чрезвычайно чувствительны к микотоксинам.

Таким образом, имеется постоянная угроза для птицеводства от микотоксинов в кормах. Для сельскохозяйственной птицы — это снижение продуктивности (вследствие ухудшения усвояемости корма) и воспроизводства, выбраковка и повышенная летальность. Для предприятия — материальные затраты на выбраковку зерна и концентрированных кормов, дополнительные расходы на лечение стада и в итоге недополучение прибыли.

При поступлении малых доз микотоксинов с кормом клинические признаки токсикоза у птицы проявляются только при определенной накопительной концентрации, но постепенное снижение продуктивности неизбежно.

Проведение дополнительных лечебных мероприятий против отравления ядами плесневых грибов составляет весомую часть экономических затрат птицеводческих хозяйств. Часты случаи, когда применяют ветеринарные препараты с активностью в отношении выделенного патогена, а ожидаемого эффекта не наблюдают. Это можно объяснить тем, что возможным пусковым механизмом интоксикации являются микотоксины, поступающие с кормом.

Одним из важных пунктов эффективной борьбы с микотоксикозами и получения чистой конечной

продукции птицеводства является микотоксикологический мониторинг поступающих на предприятие сырья и готовых комбикормов. Лабораторные исследования покажут отсутствие или наличие в них токсических метаболитов плесневых грибов. Своевременное их обнаружение предотвратит негативные последствия для экономики предприятия.

Более 100 стран, в том числе Российская Федерация и другие страны Таможенного союза, установили допустимые нормы для микотоксинов в сырье, кормах и пищевых продуктах — Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011.

В основе контроля качества и безопасности продукции растительного и животного происхождения лежат нормативы содержания различных компонентов и показатели безопасности продовольственного сырья и пищевой продукции, предусмотренные правовыми актами (технические регламенты, ГОСТы, ТУ, МУ и др.) Оценка качества и безопасности продукции осуществляется аккредитованными в законодательном порядке научно-исследовательскими институтами, межобластными лабораториями и референтными центрами системы Россельхознадзора [5]. В частности, Техническим регламентом Таможенного союза «О безопасности зерна» установлены предельно допустимые уровни содержания микотоксинов в зерне, поставляемом на пищевые и кормовые цели.

Химические методы анализа качества готовой продукции и сельскохозяйственного сырья достаточно трудоемки, занимают много времени, требуют специальных реактивов и квалифицированных специалистов-аналитиков. В настоящее время широкое применение получили инструментальные (физико-химические) методы анализа, в том числе для определения микотоксинов в сельскохозяйственной продукции и сырье.

При определении содержания микотоксинов в сырье и готовых кормах наиболее часто используются хроматографические методы (газожидкостная хроматография совместно с масс-спектрометрией, высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-спектрометрической, флуоресцентной или масс-спектрометрической детекцией) с различными вариантами пробоподготовки, а также более экономичные скрининговые способы. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии обеспечивает высокую точность результатов и позволяет определять несколько микотоксинов одного или разных классов. Используется в качестве подтверждающего исследования, но требует наличия квалифицированных кадров и дорогостоящего оборудования.

Скрининг-методы отличаются быстротой и удобны для проведения серийных анализов. Они позволяют быстро и надежно разделять загрязненные и незагрязненные образцы. К таким широко распространенным исследованиям относится как тонкослойная хроматография (ТСХ) для одновременного определения до 30 различных микотоксинов, так и иммунохимический анализ (ИХА), а также методы твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА),

обладающие высокой селективностью благодаря применению специфических антител, а также большой пропускной способностью. Хотя эти способы скрининга с использованием экспресс-тестов не столь точны, они позволяют оперативно определить наличие (а метод ИФА — и количество) микотоксинов и оперировать большими выборками образцов [6].

Твердофазный анализ ИФА (ELISA) относится к группе иммунохимических тактик биохимического исследования и обладает определенными преимуществами:

- оперативность;
- высокая производительность (на одном планшете проводится несколько десятков анализов одновременно);
- простота пробоподготовки и проведения измерений;
- низкая стоимость анализа по сравнению с хроматографическими методами;
- малый объем тестируемого образца.

Иммуноферментный анализ (ИФА), основанный на высокоспецифическом взаимодействии антигена и антитела, обычно используется для мониторинга наличия микотоксинов выше определенного уровня (или их отсутствия) в испытуемом образце. Он имеет невысокую стоимость и относительно прост в использовании, но при этом позволяет проводить количественный или качественный скрининг большого числа образцов за короткое время. Для определения содержания целого ряда микотоксинов (афлатоксина В₁, охратоксина А, Т-2 токсина, зеараленона, фумонизина В₁ и других) в зерновых кормах, зернобобовых кормовых культурах, искусственно высушенных и грубых кормах, продукции комбикормовой промышленности, сырье для производства кормов и кормовых добавках иммуноферментным методом разработан соответствующий ГОСТ 34140-2017 «Продукты пищевые, корма, продовольственное сырье. Метод определения микотоксинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием».

Для экспресс-определения микотоксинов в пробах зерна, кормов и компонентов для их производства методами иммунохимического анализа разработаны специальные методические указания (утв. Россельхозом 10.10.2005 № 5-1-14/1001).

Большинство тест-наборов для иммуноферментного определения содержания микотоксинов в сырье и готовых кормах представлены следующими торговыми марками: Ridascreen (R-Biopharm, Германия), Agra Quant (Romer Labs, Австрия), Veratox (Neogen Corporation, США), Helica (Hygiene, США), ELISA Kit и Test Kit (Elabscience Biotechnology Co, Ltd, Китай).

ГК ВИК предлагает обратить внимание на тест-наборы Helica ELISA от Hygiene (США), предназначенные для количественного определения микотоксинов в зерне, сырье для кормов и готовых комбикормах. Наборы представляют собой реагенты для экспресс-анализа, которые могут использоваться в любых анализаторах ИФА, с фильтром чтения 450 нМ.

Таблица 1

Тест-наборы для определения микотоксинов Helica ELISA

Название набора	Анализируемый токсин
Hygiene Helica Total Aflatoxin Low Matrix	афлатоксин общий с низким содержанием
Hygiene Helica MycoTox Total Aflatoxin ELISA	афлатоксин общий
Hygiene Helica Total Aflatoxin Hydro ELISA	афлатоксин общий, водная экстракция
Hygiene Helica Total Aflatoxin (Rapid)	афлатоксин общий, быстрый тест
Hygiene Helica Aflatoxin B1 (Low Matrix)	афлатоксин B1 с низким содержанием
Hygiene Helica Aflatoxin B1 (Rapid Format)	афлатоксин B1, быстрый тест
Hygiene Helica Aflatoxin M1 Low Matrix (High Sensitivity)	афлатоксин M1 с низким содержанием (высокая чувствительность)
Hygiene Helica Deoxynivalenol (DON)	дезоксиниваленол (DON)
Hygiene Helica Fumonisin	фумонизин
Hygiene Helica Fumonisin Hydro	фумонизин, водная экстракция
Hygiene Helica Ochratoxin A Universal	охратоксин А с низким содержанием (универсальный)
Hygiene Helica T-2 Toxin	T-2 токсин
Hygiene Helica Zearalenone	зеараленон

На базе производственной ветеринарной лаборатории птицефабрики Центрального региона РФ были выполнены сличительные исследования тест-наборов Hygiene Helica ELISA, а именно для количественного определения T-2 токсина и для определения низкого содержания зеараленона в пробах комбикорма и соевого шрота. В качестве референсного был использован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с двойной масс-спектрометрической детекцией на оборудовании Agilent 1290/AB SCIEX Triple Quad 5500 согласно стандартной методике (ГОСТ 34140-2017 «Продукты пищевые, корма, продовольственное сы-

рье. Метод определения микотоксинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием») в ИЦ ФНЦ «ВНИТИП» РАН.

В качестве образцов использовали пробы комбикорма Финиш-1 и соевый шрот. Результаты исследований представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты исследований на микотоксины комбикорма Финиш-1 и соевого шрота

Проба	Микотоксины	ВЭЖХ мкг/кг	Helica ELISA, мкг/кг	Отклонение от ВЭЖХ, %
Комбикорм Финиш-1	T-2	10,93	11,179	2,2
	зеараленон	37,4	38,414	2,6
Шрот соевый	T-2	менее 3,5	2,475	0
	зеараленон	173,7	164,401	5,3

Как видно из результатов исследований, разница определяемых концентраций T-2 токсина и зеараленона при использовании наборов реагентов Hygiene Helica ELISA и эталонного метода ВЭЖХ с двойной масс-спектрометрией составляет не более 5,3%.

На основании сличительных исследований, проведенных на базе производственной ветеринарной лаборатории птицефабрики Центрального региона, рекомендуем использовать наборы реагентов Hygiene Helica ELISA для мониторинга наличия микотоксинов в комбикормах и компонентах корма. Тест-наборы реагентов относительно просты в использовании, не требуют дорогостоящего оборудования и дополнительных расходных материалов. Все этапы реакции выполняются в короткие временные сроки вне зависимости от числа тестируемых образцов. Экспресс-определение микотоксинов с помощью тест-наборов Hygiene Helica ELISA сочетает в себе низкую себестоимость и высокую точность.

Быстрая оценка содержания микотоксинов в кормах и продовольственном сырье позволяет специалистам соблюдать установленные нормы по их содержанию, принимать оперативные управленческие решения по корректировке технологий производства, транспортировке и хранению, обеспечивающие безопасность сельскохозяйственной продукции.

Литература

- Corrier, D. E. Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression / D. E. Corrier // Veterinary Immunology and Immunopathology, 30:73. 1991. — P. 87.
- Гласкович, М. А. Микотоксины в кормах. Факторы, предупреждающие их развитие и рост / М. А. Гласкович // Ветеринарное дело. — 2022. — № 5 (131). — С.42–48.
- Успенская, Г. Д. Экологическая адаптация и эволюция грибов / Г. Д. Успенская // Микология и физиопатология. — 1980. — Т. 14. Вып. 3. — С. 259-262.
- Бакулин, В. А. Болезни птиц / В.А. Бакулин. — СПб., 2006. — 343 с.
- Микотоксины и микотоксикозы / Под ред. Дуарте Диаза. — М.: Печатный Город, 2006. — 382 с.
- Федоренко, В.Ф. Методы и инструменты контроля качества с.-х. продукции / В. Ф. Федоренко, Д. С. Буклагин. — М.: Росинформагротех, 2017. — 296 с.