

ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНЫЙ КОНТРОЛЬ МИКОТОКСИНОВ В КОРМАХ

Авторы: Седых Елена Сергеевна (Московский Государственный Университет Пищевых Производств)
Кесватера Галина Александровна (Московский Государственный Университет Пищевых Производств)

Аннотация: Возрастающие требования к качеству продукции сельского хозяйства обуславливают необходимость развития и применения современных методов контроля безопасности продукции сельского хозяйства и кормов. Поэтому выявление и анализ методов и средств контроля безопасности сельскохозяйственной продукции и кормов в процессе производства, переработки и хранения является актуальной задачей. Ключевые слова

Ключевые слова: Микотоксины, иммуноферментный анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография, тест-набор, контроль

Микотоксины — это вторичные метаболиты микроскопических грибов (плесеней), обладающие токсичными свойствами. В природе они обеспечивают выживание и конкурентоспособности плесневых грибов в различных экологических нишах. Микотоксины образуются из небольшого числа простых метаболитов растений (ацетат, малонат, мевалонат и аминокислоты) путем нескольких видов химических реакций (конденсации, окисления-восстановления, алкилирования, что обеспечивает их разнообразную химическую структуру.

Список основных микотоксинов, подлежащих контролю в кормах на территории Евросоюза, включает в себя афлатоксин В1 (АФ/В1), алколоиды эргота, зеараленон (ЗЕА), охратоксин (ОТ), фумонизин (Ф), микофеноловая и циклопиазоновая кислота, патулин, ниваленон (НИВ), трихотецины (ТХТ): деоксиниваленон (ДОН), Т-2 и НТ-2 токсины [4].

Материалы и методы

В работе руководствовались «ОФС.1.7.2.0033.15 Метод иммуноферментного анализа»; «Техническим регламентом Таможенного союза 015/2011 Технический регламент Таможенного союза "О безопасности зерна"». А также «ГОСТом 34140-2017 Продукты пищевые, корма, продовольственное сырье. Метод определения микотоксинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. «ГОСТом 31653-2012 Корма. Метод иммуноферментного определения микотоксинов».

Результаты исследований и обсуждение

В любом растительном кормовом сырье в том или ином количестве присутствуют споры плесневых грибов. При наступлении благоприятных условий они прорастают. А при любых неблагоприятных факторах (температура, химические вещества) грибковые микроорганизмы начинают вырабатывать ядовитые метаболиты.

Биохимики выделяют пять основных путей биосинтеза

микотоксинов:

- поликетидный (афлатоксины, стеригматоцистин, охратоксин, патулин и др.);
- терпеноидный (трихотеценовые микотоксины);
- через цикл трикарбоновых кислот (рубратоксины);
- аминокислотный (эргоалкалоиды, споридесмин, циклопиазоновая кислота и др.);
- смешанный (сочетание двух и более основных путей) - для производных циклопиазоновой кислоты.

Основными грибами-продуцентами афлатоксинов являются токсигенные штаммы грибов *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*. В свою очередь, токсическое вещество Т-2 вырабатывает гриб *Fusarium sporotrichioides*, а микотоксины ДОН и зеараленон - *Fusarium graminearum*. Продуцентами охратоксина А в основном являются грибки рода *Aspergillus*. Продуцентами патулина являются различные виды грибов рода *Penicillium*, а также *Aspergillus* и *Byssoschlamys* [4].

Микотоксины, поступая в организм с кормом, могут вызвать **изменение состава микрофлоры в кишечнике**, а, всасываясь в желудочно-кишечном тракте, оказать негативное действие на клетки, органы, ткани, физиологическое состояние животных.

Механизм действия микотоксинов включает:

1) **ингибирование синтеза ДНК, РНК и образование аддуктов ДНК.**

Например, Охратоксин А, Т-2 токсин подавляют в клетках синтез протеина, ДНК и РНК;

2) **изменение мембранных структур.**

Микотоксины могут стимулировать липидное перекисное окисление в тканях. Это может быть результатом действия охратоксина А, Т-2 токсина, афлатоксина, фумонизина, дезоксиниваленола (ДОНа), зеараленона. Данный эффект микотоксинов во многих случаях вызван ухудшением антиоксидантной защиты организма;

3) **запуск программированной клеточной гибели.**

Например, Т-2 токсин является самым мощным фактором апоптоза.

Классификация микотоксинов до сих пор до конца не разработана.

На сегодняшний день учёные выделяют 6 категорий микотоксинов: афлатоксины, трихоцетины, фумонизины, зеараленон, охратоксины и алкалоиды спорыньи (эргоалкалоиды). Многие из них опасны для млекопитающих и птицы даже в очень малых концентрациях.

В основе иммуноферментного метода анализа (ИФА) лежит взаимодействие антигенов (определяемых антибактериальных препаратов) с антителами в лунках микротитровального полистиролового планшета.

Тест-наборы AgraQuant® – это наборы для точного и надежного

иммуноферментного анализа (ИФА) в количественном формате. В сочетании с планшетным ридером StatFax® или BioTek® ELISA можно непосредственно интерпретировать результаты и последовательно регистрировать их.

Эти тест-наборы для ИФА анализа – идеальное решение для параллельных замеров множества образцов, при которых время инкубации составляет всего около 15 минут для количества до 42 образцов.

Чтобы предотвратить ошибки использования, тест-наборы предоставляются в комплекте, готовом к использованию, и укомплектованы набором из 5 стандартов, планшетом, покрытым антителами, планшетом для разбавления, конъюгатным раствором, субстратным раствором и раствором, останавливающим реакцию [1].

Каждый тест содержит связанное в планшетах (лунках) антитело, которое является специфическим для определяемого вещества. Исследуемый и контрольные образцы добавляются в соответствующие лунки. Далее добавляется ферментный конъюгат (исследуемое вещество, химически связанное с ферментом). Исследуемый и контрольные образцы вместе с конъюгатом перемешиваются и переносятся в лунки, где они конкурируют между собой за участки связывания антител. Чем больше определяемого вещества в образце, тем меньше конъюгата связывается в лунках. После инкубации для удаления несвязанных веществ лунки промываются. Субстрат, добавляемый в лунки, изменяет цвет в присутствии конъюгата. Во время инкубации окрашивание синим цветом происходит в соответствии с количеством конъюгата против определяемого вещества в лунках. Чем больше конъюгата свяжется, тем более синей становится окраска, указывающая на меньшее количество исследуемого вещества. Выявление результатов проводится визуально: чем меньше синего цвета и больше красного, тем больше в образце исследуемого вещества. Тест является прямым иммуноферментным (ELISA) методом, обеспечивающим точное определение при содержании микотоксинов на уровне нескольких мкг/кг (ppb). Для количественного определения результаты, получающиеся измерением оптической плотности раствора на спектрофотометре (сравнивают со стандартной калибровочной кривой и определяют точную концентрацию токсина в испытуемом образце).

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) – метод, обладающий такими преимуществами, как высокая селективность, воспроизводимость и низкие пределы обнаружения. Большинство существующих нормативно-технических документов по определению содержания микотоксинов основано именно на этом методе.

Несмотря на то, что методы ВЭЖХ для определения микотоксинов уже широко распространены и валидированы при анализе различных объектов, до сих пор актуальны исследования по разработке новых

методик. Предметом научного интереса является увеличение производительности анализа за счет уменьшения времени единичного определения и увеличение чувствительности анализа [3].

Определение микотоксинов методом ВЭЖХ, как правило, включает в себя стадию дериватизации определяемых компонентов. Дериватизация может быть как постколоночной, так и предколоночной, а в качестве дериватирующих агентов используют о-фталевый дикарбоксальдегид, 9-(Флуоренилметил)хлорформиат, растворы галогенов. Однако некоторые токсины имеют природную флуоресценцию, в том числе и афлатоксины, поэтому имеется возможность их прямого определения без процедуры дериватизации. Это значительно упрощает процедуру анализа, сокращает время и стоимость единичного определения.

Сравнивая метод ИФА с ВЭЖХ\МС можно сказать, что высокоэффективная жидкостная хроматография отличается высокой специфичностью, точностью и возможностью определения веществ в минимальных концентрациях. Однако этот метод очень дорогостоящий и ведущее значение занимает пробоподготовка, на которую отводится наибольшее количество времени, в отличие от тест-систем ИФА.

Заключение

В основе контроля безопасности продукции растительного происхождения лежат нормативы содержания различных компонентов, предусмотренные нормативными правовыми актами (технические регламенты, ГОСТы, ТУ, МУ и др.), обеспечивающие необходимый контроль и применение соответствующих методик выполнения. Для определения содержания микотоксинов наиболее часто используются хроматографические методы с различными вариантами пробоподготовки, а также более экономичные скрининговые методы, среди которых наибольшее распространение получил метод ИФА, относящийся к группе иммуно- химических методов анализа. Преимущество этого метода: оперативность, высокая производительность, простота пробоподготовки и проведения измерений, низкая стоимость анализа и малый объем тестируемого образца.

ЛИТЕРАТУРА

- 1.ОФС.1.7.2.0033.15 «Метод иммуноферментного анализа».
2. ТР ТС 015/2011 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности зерна»
3. ГОСТ 31653-2012 Корма. Метод иммуноферментного определения микотоксинов
4. Масалов В.Н., Михеева Е.А., Смагина Т.В. Микотоксины: воздействие и последствия. Методы решения проблемы:- Ветеринария

LITERATURE

1. OFS.1.7.2.0033.15 "Method of enzyme immunoassay".
2. TR CU 015/2011 Technical regulation of the Customs Union "On the

safety of grain"

3. GOST 31653-2012 Feed. The method of enzyme immunoassay for the determination of mycotoxins

4. Masalov V.N., Mikheeva E.A., Smagina T.V. Mycotoxins: impact and consequences. Methods for solving the problem:- Veterinary