УДК 619:615.3: 28.053.2

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ МИКОТОКСИНОВ В ОРГАНАХ, ТКАНЯХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ (ОБЗОР)

## Панковец Е.М., Лях А.Л.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Введение. Микотоксины – это продукты биосинтеза плесневых грибов, которые, выделяясь в процессе их жизнедеятельности и попадая с кормом в организм животных, способны оказывать системный токсический эффект. Эволюционно так сложилось, что для плесеней повышенное образование является защитно-приспособительным механизмом, микотоксинов направлен на выживание плесневых грибков в неблагоприятных для них условиях. работа, Широкомасштабная связанная с внедрением различных снижения контаминации плесенями растительного сырья в процессе выращивания на полях, усовершенствование технологии заготовки и хранения зерновых и объемистых кормов, а также использование сорбентов [1, 3, 4], способствующих ограничению всасываемости микотоксинов из просвета пищеварительного тракта в кровь, позволила уменьшить концентрации микотоксинов в кормах ниже значений предельно допустимых уровней (ПДУ), которые приняты в Республике Беларусь. Результатом данных мероприятий послужило значительное снижение случаев острых, клинически видимых микотоксикозов как у животных, так и у людей.

Однако, учитывая кумулятивный эффект микотоксинов, до сих пор актуальной остается проблема скрытых микотоксикозов [5], а также определение концентрации микотоксинов в органах лабораторными методами, особенно на фоне постоянного попадания в организм микродоз различных микотоксинов [2]. Иммуноферментный анализ – это лабораторный метод диагностики, который основан на принципе связывания антигена (в данном случае микотоксина), со специфическим антителом (иммуноглобулином). Иммуноферментный анализ для определения уровня микотоксинов в кормах давно зарекомендовал себя как относительно недорогой, довольно быстрый лабораторный тест, который повсеместно используется в стране. На данный момент в Республике Беларусь нет валидированной методики по определению концентраций микотоксинов в органах и тканях животных при помощи ИФА. Учитывая высокую специфичность данного метода (антиген связывается строго с определенным антителом), а также высокую чувствительность (т.е. способность определить мельчайшие концентрации антигена), при соблюдении правил по пробоподготовке, возможно определять концентрации микотоксинов в органах и тканях, по своей точности сравнимых с референтными хроматографическими методами.

**Материалы и методы исследований.** Данная статья посвящена обзору литературных источников, в которых описывается применение ИФА в данном направлении.

**Результаты исследований.** Известно, что ряд микотоксинов, за исключением своей острой токсичности, являются термически стабильными, а также обладают

способностью к биоаккумуляции [21, 25, 30]. В последние годы учеными всего мира проводится анализ микотоксинов в биологических образцах Преследуются разные цели: от разработки аналитических методов до определения содержания микотоксинов в органах, в том числе их связь с некоторыми заболеваниями (например, нефропатии), токсикокинетикой микотоксинов (поглощение, распределение, метаболизм, элиминация). Наиболее распространенные исследования были сосредоточены на разработке методов определения микотоксинов. Это связано c высокими требованиями чувствительности тестов для определения микотоксинов, учитывая, как правило, крайне низкие уровни микотоксинов в биологических образцах [27]. Как следствие этого, загрязнение микотоксинами было зарегистрировано не только в ряде сельскохозяйственных товаров, но также в продуктах животного происхождения, биологических жидкостях и тканях людей и животных в географически различных местах [19,29].

В 2017 г. ученые из лаборатории токсикологии и химии продуктов питания в Испании провели обзор исследований, проведенных в течение последнего десятилетия, посвященных методам обнаружения микотоксинов в тканях и биологических жидкостях животных и человека [27]. В данной статье отражены основные методы экстракции, из которых наиболее часто использовались жидкостно-жидкостная экстракция (24%), твердофазная экстракция (19%) и иммуноаффинная очистка либо несколько методик одновременно. Наиболее предпочтительными способами детекции различных микотоксинов в сыворотке крови, моче, желчи, а также в трубчатых и паренхиматозных органах были жидкостная хроматография с масс-спектрометрией (55%), также использовались другие системы обнаружения, такие как ELISA (8%).

Сообщество по исследованию микотоксинов в Берлине [12] проделало работу по сравнению уровня охратоксина А в тканях и биологических жидкостях свиней после скармливания животным загрязненной диеты (250 мкг ОТА/кг корма) в течение 4 недель. После убоя на 28 день 5 свиней из опытной и 5 свиней из контрольной группы были подвержены патологоанатомическому исследованию. У каждого животного отбирались образцы внутренних органов, после чего проводилось определение уровня ОТА при помощи ELIZA и ВЭЖК. Для определения ОТА методом ELIZA проводилась гомогенизация отобранных органов, экстракция этилацетатом [12] с центрифугированием с гидрокарбонатом натрия. В конце полученная надосадочная жидкость нагревалась на водяной бане  $100^{0}$ C после добавления дистиллированной при остывания И использовалась исследования. Иммуноанализ **ELISA** проводили ДЛЯ использованием набора Ridascreen OTA компании «R-Biopharm» (Дармштадт, Германия). На основании полученных результатов оба реализованных метода (ВЭЖК и ELIZA) были признаны подходящими для надежного и эффективного определения ОТА в различных биологических материалах [12].

Похожие результаты по накоплению ОТА в тканях были получены на птице [28]. ОТА накапливается в плазме и распространяется во всех органах с высоким уровнем в печени и почках. Подготовка образцов включала гомогенизацию тканей в мельнице, затем 5 г каждого образца переносили в центрифужную пробирку. Добавляли 7 мл лимонной кислоты и 10 мл дихлорметана, встряхивали в течение 5 минут, перемешивали на горизонтальном шейкере в течение 1 часа при комнатной температуре и центрифугировали в течение 20 минут при 3000 об\мин Два

миллилитра из нижней дихлорметановой фазы переносили в коническую пробирку, добавляли 2 мл 1%-ного бикарбонатного буфера (pH = 8,8), и смесь встряхивали в течение 30 мин., транспортируя ОА в водную фазу. Смесь центрифугировали в течение 20 минут при 3000 об\мин для получения четкого разделения. Из верхнего буферного раствора в пробирку пипеткой переносили 490 мкл, добавляли 10 мкл 1 н. НС1 и перемешивали, а непосредственно в анализе использовали 50 мкл раствора [28]. Микроскопическими изменениями, которые могли быть в первую очередь связаны с воздействием токсинов, были гломерулонефроз, тубулонефроз с очаговой пролиферацией эпителиальных клеток в канальцах и множественные аденомоподобные структуры в почечной паренхиме. Методы ВЭЖХ и ИФА дали сходные результаты по концентрации ОТА в тканях. Незначительные различия в абсолютных концентрациях тканевого токсина, полученных этими двумя методами, могут быть отнесены на счет различных процедур экстракции и очистки, а также специфичности антител [28].

Целью другого исследования было сравнение эффектов перорального и интраназального воздействия DON (5 мг / кг массы тела), уровня его распределения в тканях и индукции провоспалительных цитокинов у самок мышей. Органы мышей (40–200 мг) гомогенизировали и гомогенат центрифугировали при 15000 об\мин в течение 10 минут. Фракцию супернатанта сначала нагревали при 100°С в течение 5 минут для инактивации эндогенных ферментов и осаждения белков и затем центрифугировали при 15000 об\мин в течение 10 минут. Полученный супернатант использовали для измерения DON в тканях с помощью высокочувствительного ELISA набора компании «Veratox». Конкурентный прямой ИФА показал, что, независимо от пути воздействия, концентрации DON в селезенке, печени, легких и почек были максимальными в течение 15–30 мин. и снижались на 75–90% после 120 мин. Однако концентрация DON в плазме и тканях после интраназального введения была в 1,5–3 раза выше по сравнению с оральным путем попадания микотоксина в организм [8, 24].

Появление и использование проверенных биомаркеров по оценке воздействия микотоксинов на организм позволяет более точно диагностировать микотоксикозы в сельском хозяйстве, а также проводить биомониторинг у людей. Для биомониторинга накопления микотоксинов y человека использовались легкодоступные биологические матрицы, такие как моча или кровь, причем моча была предпочтительна за счет неинвазивного отбора проб [17]. Исследования по биомониторингу микотоксинов часто проводились практически во всем мире, включая Нигерию [18], Турцию [23], Бельгию [10, 16], Испанию [15], Германию [7, 13, 14], Италию [26, 31], Австрию [9], Чешскую Республику [11, 22], Иран [20] и Китай [6].

Заключение. Учитывая данные литературы, иммуноферментный анализ показал хорошую корреляцию с ВЭЖК при определении микотоксинов в органах, тканях и биологических жидкостях животных и человека. Учитывая более доступную стоимость ИФА-диагностики, по сравнению с хроматографическими методами, а также легко выполнимую подготовку образцов, что значительно ускоряет время проведения теста, иммуноферментный анализ более предпочтителен для так называемого скрининга по определению уровня кумуляции микотоксинов на свиноводческих комплексах, птицефабриках и на других крупных сельскохозяйственных производствах.

**Литература.** 1. Брезвин, О. М. Определение сорбционной активности кормовых добавок «ХамекоТокс» и «Цеолит» / О. М. Брезвин, З. А. Гута // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. — Витебск, 2016. — Т. 52, вып. 1. – С. 110-113. 2. Великанов, В. В. Диагностика и профилактика кормовых микотоксикозов у молодняка свиней / В. В. Великанов, А. П. Курдеко // Ветеринарный журнал Беларуси. — 2017. – № 2. – С. 26-29. 3. Крайнова, А. В. Адсорбционная эффективность кормовой добавки «Минезел Min-d-Gel» по отношению к продуктам гриба Aspergillus – афлатоксину / А. В. Крайнова, М. А. Гласкович // Студенты — науке и практике АПК: материалы 103-й Международной научно-практической конференции студентов и магистрантов, г. Витебск, 22-23 мая 2018 г. / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск : ВГАВМ, 2018.-4.1: Ветеринарная медицина. -C.239-241. 4. Микулич, Е. Л. Морфологические перестройки почек и печени свиней при кормовых микотоксикозах и при добавлении адсорбента микотоксинов « $\Phi$ унгинорм» / E. Л. Микулич, В. И. Бородулина // Современные проблемы и перспективы исследований в анатомии и гистологии животных : материалы Международной научно-практической конференции, посвященной памяти профессора Д. Х. Нарзиева, Витебск, 31 октября—1 ноября 2019 г. / Витебская государственная академия ветеринарной медицины, Самаркандский институт ветеринарной медицины. – Витебск : ВГАВМ, 2019. – С. 129-131. 5. Мониторинг содержания микотоксинов в кормах / И. Н. Дубина [и др.] // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2015. – Т. 51, вып. 1, ч. 1. – С. 37- 41. 6. A biomarker surve of urinary deoxynivalenol in China : The Shanghai Women's Health Study / P. C. Turner [et al.] // Food Addit. Contam. – 2011. – Vol. 28. - 1220-1223. 7. Ali, N. Ochratoxin A and its metabolites in urines of German adults - An assessment of variables in biomarker analysis / N. Ali, N. Muñoz, G. H. Degen // Toxicol. Lett. – 2017. – Vol. 275. – P. 19-26. 8. Amuzie, C. J. Tissue distribution and proinflammatory cytokine induction by the trichothecene deoxynivalenol in the mouse: Comparison of nasal vs. oral exposure / C. J. Amuzie, J. R. Harkema, J. J. Pestka // Toxicology. -2008. -Vol. 248, No. 1. -P. 39-44. 9. Assessment of human deoxynivalenol exposure using an LC-MS/MS based biomarker method / B. Warth [et al.] // Toxicol. Lett. - 2012. - Vol. 211. - 85-90. 10. Assessment of mycotoxin exposure in the Belgian population using biomarkers: Aim, design and methods of the BIOMYCO study / E. Heyndrickx [et al.] // Food Addit. Contam. Part A. – 2014. – Vol. 31. – P. 924-931. 11. Comparison of ELISA and HPLC methods for determination of ochratoxin A in human blood serum in the Czech Republic / V. Dohnal [et al.] // Food Chem. Toxicol. - 2013. -Vol. 62. – P. 427-431. 12. Comparison of ochratoxin A levels in edible pig tissues and in biological fluids after exposure to a contaminated diet / J. Pleadin [et al.] // Mycotoxin Research. -2016. -Vol. 32, No. 3. -P. 145-151. 13. Degen, G.H. Biomonitoring of ochratoxin A in grain workers / G.H. Degen, S. Mayer, M. Blaszkewicz // Mycotoxin Res. – 2007. – Vol. 23. – P. 88-93. 14. Evidence of ochratoxin A conjugates in urine samples from infants and adults / K. Muñoz [et al.] // Mycotoxin Res. – 2017. – Vol. 33. – 39-47. 15. Exposure assessment approach through mycotoxin/creatinine ratio evaluation in urine by GC-MS/MS / Y. Rodríguez-Carrasco [et al.] // Food Chem.Toxicol. - 2014. - Vol. 72. - P. 69-75. 16. Human biomonitoring of multiple mycotoxins in the Belgian population: Results of the BIOMYCO study / E. Heyndrickx [et al.] // Environ. Int. - 2015. - Vol. 84. - P. 82-89. 17. Mally, A. Biomonitoring of the mycotoxin Zearalenone: Current state-of-the art and application to human exposure assessment / A. Mally, M. Solfrizzo, G. H. Degen // Arch. Toxicol. – 2016. –Vol. 90. – P. 1281-1292. 18. Mycotoxin exposure in rural residents in northern Nigeria: A pilot study using multi-urinary

biomarkers / C.N. Ezekiel [et al.] // Environ. Int. – 2014. – Vol. 66. – P. 138-145. 19. Natural Occurrence, Analysis, and Prevention of Mycotoxins in Fruits and their Processed Products / J. Yang [et al.] // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – Vol. 54, №1. – P. 64-83. 20. Occurrence of Ochratoxin A and Aflatoxin M1 in human breast milk in Sari / P. Afshar [et al.] // Food Control. – 2013. – Vol. 31. – P. 525-529. 21. Ochratoxin A in raw materials and cooked meat products made from OTA-treated pigs / N. Perši [et al.] // Meat Science. – 2014. – Vol. 96, № 1. – P. 203-210. 22. Ochratoxin A levels in blood serum of Czech women in the first trimester of pregnancy and its correspondence with dietary intake of the mycotoxin contaminant / F. Malir [et al.] // Biomarkers. - 2013. - Vol. 18. - 673-678. 23. Ochratoxin A: Is it present in breast milk samples obtained from mothers from Ankara / A. Gürbay [et al.] // J. Appl. Toxicol. – 2009. – Vol. 30. – P. 329-333. 24. Pestka, J. J. Immunochemical assessment of deoxynivalenol tissue distribution following oral exposure in the mouse / J. J. Pestka, Z. Islam, C. J. Amuzie // Toxicology Letters. – 2017. – Vol. 178, № 2. – P. 83-87. 25. Preparation of a broad-spectrum anti-zearalenone and its primary analogues antibody and its application in an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay / G. Dong [et al.] // Food Chemistry. – 2018. – Vol. 247. – P. 8-15. 26. Solfrizzo, M. Assessment of Multi-Mycotoxin Exposure in Southern Italy by Urinary Multi-Biomarker Determination / M. Solfrizzo, L. Gambacorta, A. Visconti // Toxins. -2014. -Vol. 6. -P. 523-538. 27. Studies on the Presence of Mycotoxins in Biological Samples: An Overview / L. Escrivá [et al.] // Toxins. - 2017. - Vol. 9, № 251. - P. 1-33. 28. Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in *chickens / K. Biró [et al.] // Avian Pathology.* − 2002. − *Vol. 31, № 2.* − *P. 141-148.* 29. *Trace* mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatographyatmospheric pressure ionisation mass spectrometry / P. Zöllner, B Mayer-Helm // Journal of Chromatography. – Vol. 1136,  $N_2$  2. – P. 123-169. 30. Turner, N. W. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review / N. W. Turner, S. Subrahmanyam, S. A. Piletsky // Analytica Chimica Acta. – Vol. 632, No. 2. – P. 168-180. 31. Zearalenone screening of human breast milk from the Naples area / F. Massart [et al.] // Toxicol. Environ. Chem. – 2016. – Vol. 98. – P. 128-136.

УДК 619:616.34-002-084:615.246:636.4.053

## ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ НАТРИЯ ГИПОХЛОРИТА ПРИ ГАСТРОЭНТЕРИТЕ У ПОРОСЯТ

## Петровский С.В., Белко А.А., Дремач Г.Э.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Введение. В условиях промышленных свиноводческих комплексов у поросят в до- и послеотъемный период выращивания широко распространены гастроэнтериты, которые имеют первичное и вторичное происхождение. Развитие у поросят-отъемышей первичных гастроэнтеритов связано с тремя «Н» кормления: недостаточным (недокормом), неполноценным (по энергии, протеину и витаминноминеральной группе) и некачественным (кормами, содержащими экзотоксины — микотоксины, нитраты, соединения меди, цинка, пестициды и др.) кормлением. Недостаточное и неполноценное кормление ведут к извращению аппетита («лизухе»), что сопровождается поврежденем слизистой оболочки желудка и