Автори:
В.Г. Єфімов, кандидат ветеринарних наук, доцент, завідувач відділу фізіології, біохімії та хіміко-токсикологічного аналізу
Д.М. Софонова, молодший науковий співробітник
Д.М. Масюк, кандидат ветеринарних наук, професор, директор
НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК
Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет

Діагностика та профілактика мікотоксикозів тварин: сучасний погляд

В сучасних умовах ведення тваринництва, яке характеризується значним ступенем спеціалізації і концентрації поголів'я у великих господарствах, відбувається суттєве зростання потреби у зерні та комбікормах. Проте, умовам їх отримання і зберігання, як правило, належна увага не приділяється. Тому зараження зерна грибами та продуктами їх життєдіяльності в сучасних умовах є серйозною проблемою як для виробників, так і для зернотрейдерів, комбікормових підприємств і тваринницьких ферм, що спричинює великі економічні збитки.

За деякими даними, забруднення сільськогосподарських продуктів мікотоксинами досягає 25% і, в глобальному масштабі, втрати, спричинені грибами, за даними ФАО, досягають 16 млрд доларів США.

Наявність мікотоксинів та їх токсикогенний ефект було встановлено впродовж відносно короткого часу, починаючи з 1961 року (афлатоксини) і закінчуючи 90-ми роками минулого століття (фумонізини). В цей час удосконалювались методи ідентифікації мікотоксинів, вивчалась їх структура і вплив на організм людини і тварин. Паралельно, звісно, розширювався і арсенал методів досліджень, починаючи від найпростіших (ТШХ) до найсучасніших (ВЕРХ-МС-МС).

На сьогоднішній день виділяють всього лише близько двох десятків видів грибів, здатних виділяти низькомолекулярні вторинні метаболіти, які володіють токсичністю, тобто, мікотоксини. На відміну від антибіотиків, мікотоксини є слабоактивними стосовно мікроорганізмів, але дуже токсичними для тварин і людини. Механізми дії більшості мікотоксинів, яких виявлено до 500, пов'язані із пригніченням білкового синтезу або синтезу нуклеїнових кислот, тому навіть у дуже низьких концентраціях вони пригнічують продуктивність, відтворну здатність та імунний статус.

Основними продуцентами мікотоксинів на полях є гриби родів Alternaria, Cladosporium, Fusarium та Helminthosporium. Для свого росту вони потребують високої вологості повітря і паразитують на рослинах, як правило, під час їх вегетації. Значна кількість грибів, особливо роду Aspergillus, можуть уражувати рослинні субстрати уже при 13-14% вологості. Навіть незначне зростання вологості субстрату (на 0,2-0,5%) призводить до швидкого росту токсикогенних A. flavus та A. candidus. В подальшому, при підвищенні вологості, інтенсивний ріст виявляють гриби роду Penicillium.

Афлатоксикоз

Афлатоксикоз був вперше встановлений у 1960 році на фермах Англії, де загинуло понад 100 тисяч індичок віком від 2 до 20 тижнів. Невдовзі подібні клінічні ознаки, які виявлялись апатичністю, втратою апетиту, опістотонусом, були встановлені у фазанів та каченят. Коли було виключено всі відомі токсикологічні, інфекційні та паразитарні фактори, було виявлено, що всій загиблій птиці згодовували арахісове борошно. В 1962-1963 рр., в Лондоні було виділено токсичний фактор, який у чистому вигляді викликав клінічні ознаки описаної хвороби. Назвали його афлатоксин, бо він являвся продуктом життєдіяльності плісневого грибу A. flavus. Всього виділяють чотири основних афлатоксини: B_1, B_2, G_1, G_2, які різняться за хроматографічною рухливістю. Основними продуцентами є A. flavus Link та A. parasiticus Speare, а основними джерелами – арахіс, кукурудза, інше зерно та насіння олійних культур.

Афлатоксини безпосередньо впливають на оболонки і мембрани органел, пригнічуючи синтез білка, нуклеїнових кислот та ліпідів. Вони володіють вираженими мутагенними та тератогенними ефектами. Афлатоксини викликають розвиток гепатиту, гепатомегалії, цирозу і раку печінки у людини, а у сільськогосподарських тварин також підвищують загибель молодняку.

Отруєння афлатоксинами в основному викликає у тварин ушкодження печінки, ступінь якого залежить від виду тварин, віку, статі та характеру годівлі. Афлатоксикоз призводить до різного роду гепатопатій, зниження молочної продуктивності у корів та несучості у птиці. Дія афлатоксинів призводить до зниження імунного статусу, що проявляється підвищенням сприйнятливості до патогенних мікроорганізмів. Тривале згодовування кормів, що містять низькі концентрації афлатоксину, може спричинювати ембріональну смертність.

Зазвичай, молоді тварини більш чутливі до дії афлатоксинів. Клінічна картина характеризується розладами функції травлення, зменшення показників відтворної функції. Спостерігається зменшення конверсії корму, розвивається анемія.

Після трансформації в організмі корів з молоком виділяються афлатоксини M_1 та M_2. За даними міністерства сільського господарства США, економічні збитки, спричинені молочному

скотарству забрудненням кормів цими мікотоксинами, сягають 10%.

Охратоксикоз

Охратоксин А вперше виділили південноафриканські дослідники із летальної для каченят, щурів та мишей культури A. ochraceus Wilh. Були виділені також і споріднені сполуки – охратоксини В і С. Продуцентами охратоксину є також інші види із роду Aspergillus: A. alliaceus, A. melleus, A. ostianus та інші, а також декілька видів Penicillium – P. conmecne, P. cyclopium, P. variable.

Біологічна дія охратоксинів, які представляють собою нефротропні отрути з вираженою тератогенною дією, заключається в порушені синтезу білка, РНК, порушенні обміну вуглеводів.

Охратоксикоз птиці є предметом досліджень починаючи з 1965 року. Зокрема, було описано спонтанну нефропатію у птиці в Данії, пов'язану з охратоксином А. Значних збитків наніс охратоксикоз птахівництву США. Основним джерелом виявилась кукурудза та кукурудзяне борошно. Гістопатологічно виявляли зміни, які характеризуються некрозом, атрофією та дегенерацією проксимальних і дистальних канальців нирок. У курей охратоксикоз характеризується зниженням несучості, погіршенням якості шкаралупи та явищами нефропатії, а у бройлерів – відставанням в рості, погіршенням пігментації тушок і ураженням нирок.

Охратоксин у свиней у високих дозах (1,0-2,0 мг/кг) спричинює некротичні зміни в ниркових канальцях, що веде до розвитку протеїнурії та глюкозурії, а також зниження щільності сечі. Крім того, розвиваються ураження слизової оболонки травного каналу з проявом розладів травлення, а також розвиток жирової дистрофії печінки.

Встановлено, що згодовування охратоксину А викликає у курчат і свиней порушення функції лімфоїдних структур. У курчат та індичат спостерігається лейкоцитопенія за рахунок зниження кількості лімфоцитів, зниження фагоцитарної активності нейтрофілів. Пригнічення клітинного та гуморального імунітету залежить від дози охратоксину А і може викликати зниження резистентності тварин до збудників інфекційних захворювань, а також зменшувати ефективність вакцинації.

Т-2 токсин

Т-2 токсин відноситься до групи трихотеценових мікотоксинів. Вони є похідними циклічної системи, що носить назву «трихотекан». Продуцентами трихотеценових мікотоксинів є види цілого ряду родин грибів, які не є спорідненими таксономічно.

За структурними особливостями трихотеценові мікотоксини поділяються на чотири типи: А (Т-2 токсин, НТ-2 токсин, триходермін та ін., продуцентами яких є Fusarium spp., Myrothecium spp., Trichoderma spp.), В (фузаренон Х, ДОН, трихоцетин, продуцентами яких є Fusarium spp., Trichothecium roseum). Трихотеценові мікотоксини С та Д широкого токсикологічного значення не мають.

Т-2 токсин виробляється грибами роду Fusarium і найчастіше виявляється у вівсі, тоді, як НТ-2 – в ячмені. Дослідження, проведені в інституті птахівництва УААН, вказують, що в 12,5% проб виявляється Т-2 токсин, з яких в 32% його вміст перевищував ПДК.

У курей Т-2 токсикоз проявляється зниженням рухливості, в'ялістю, ціанозом гребінців та борідок, розвитком некрозів у ротовій порожнині та стравоході і значним зниженням яйценоскості. У бройлерів Т-2 токсикоз описаний як захворювання, що характеризується розвитком некротичних уражень ротової порожнини «чорні язички», сповільненням приростів і загибеллю. Подібні клінічні ознаки характерні для гусенят та для індичат, а саме: наявність некротичних уражень на слизовій оболонці язика та шкіри голови. Такі некротичні ураження є результатом прямої дії Т-2 токсину.

Т-2 токсин є сильним інгібітором білкового синтезу як in vitro, так і in vivo, який викликає явища некрозу та апоптозу в клітинах травного каналу та імунної системи. Таким чином, Т-2 токсин володіє сильною імуносупресивною дією, зокрема, його високий вміст в кормах зумовлює зміни в селезінці, печінці і бурсі птиці та Пейєрових бляшках свиней. Т-2 токсин викликає підвищення сприйнятливості до інфекційних збудників, зокрема родів Escherichia та Salmonella. Підвищена забезпеченість птицею вітаміном Е зменшує прояв Т-2 токсикозу.

Слід зазначити, що свині є найбільш чутливими до дії Т-2 токсину. І хоча чіткий прояв клінічної картини їх отруєння спостерігається при високих концентраціях токсину – 5-10 мг/кг корму, зміни в органах імунного захисту виявляються вже при концентраціях 0,3-0,5 мг/кг.

ДОН

ДОН (дезоксиніваленон, вомітоксин) відноситься до групи трихотеценових мікотоксинів типу В, основним продуцентом являється F. graminearum Schwabe. ДОН є найбільш поширеним фактором забруднення зерна мікотоксинами, який найчастіше зустрічається в зразках кукурудзи та пшениці, а також пшеничних висівках.

Рівень ДОН близько 1 мг/кг у свиней знижує споживання корму, а концентрація 5 мг/кг викликає відмову від кормів з подальшою прогресивною втратою маси тіла. При вмісті вомітоксину більше 10 мг/кг у свиней спостерігається блювота.

У великої рогатої худоби ДОН викликає зниження або втрату апетиту, пошкодження травного каналу, зокрема, рубця і сітки, підвищує рівень соматичних клітин та знижує фертильність (здатність до запліднення).

Птиця відносно стійка до дії ДОНу, що пояснюється наявністю у них між зобом і тонким відділом кишечнику місця абсорбції, де відбувається його трансформація в інші сполуки. $ЛД_{50}$, за деякими даними, перевищує 100 мг/кг.

Птиця в умовах експерименту толерантна до дії ДОНу. Зокрема, можна очікувати зниження споживання корму, сповільнення росту, слабо виражену анемію, зниження маси печінки, збільшення маси м'язового шлунка при рівні ДОН понад 10 мг/кг. Проте, на практиці, неодноразово відзначені випадки прояву токсикозів при значно меншому вмісті ДОН. Більшість дослідників сходяться на думці, що вміст ДОН понад 1 мг/кг потенційно може бути маркером зараження кормів іншими трихотеценовими мікотоксинами, токсичність яких вивчена недостатньо і які важко ідентифікуються. Тому ДОН варто розцінювати як один із маркерів зараженості кормів фузаріотоксинами.

Зеараленон

Зеараленон зустрічається у кормах достатньо часто, зокрема, за різними даними, він виявляється у кормах в 50% проб, досягаючи рівня 37 мг/кг.

За іншими даними, ступінь ураження зеараленоном значно менший і виявляється в 13-19% кормів.

Основними продуцентами зеараленону є широкопоширений фітопатоген F. graminearum Schwabe та F. tricinitum. Результати досліджень викликали значний резонанс і зумовили вивчення продуктів біосинтезу грибів роду Fusarium, їх фізико-хімічних властивостей та фармакологічної активності зеараленону та споріднених йому лактонів резорцинової кислоти.

Зеараленон виявляє естрогенний синдром, особливо виражений у індичок. Він був виділений як ферментативна естрогенна речовина ізоляту грибу Gibberella zeae (Gordon). У племінного поголів'я курей за вмісту зеараленону в кормах на рівні 5 мг/кг виявляється синюшність гребінців, порушення рухливості, асцит, перитоніт та сальпінгіт. Птиця є толерантною до дії зеараленону. Проте, навіть його невеликі кількості (1,5-4,5 мг/кг) сприяють зниженню яйценосності, погіршенню якості шкаралупи, зменшенню розміру яєць.

У свинок введення зеараленону у відносно низьких дозах (1,5-2,0 мг/кг) призводить до набухання вульви і потовщення стінок вагіни. Маса матки збільшується, відбувається атрофія яєчників, але без прояву рефлексу стояння. У свиноматок наявність зеараленону в межах від 5-10 мг/кг призводить до подовження статевого циклу або навіть до прояву анеструсу. Young et al. (1990) показали лінійну залежність між рівнем зеараленону і довжиною анестресу. Згодовування цього мікотоксину супоросним свиноматкам в дозі 4 мг/кг призводить до зменшення маси плодів та значної варіабельності поросят у гнізді.

Фумонізин

У свиней захворювання, спричинене зараженими фумонізином кормами, вперше було описано в 1950 рр. в Угорщині під назвою «відгодівельний набряк легень». Це було підтверджено експериментально шляхом введення фумонізину B_1, що призводить до зростання гідростатичного тиску в легеневих капілярах внаслідок серцевої недостатності та збільшення проникності судин. Однак, такий прояв токсикозу характерний лише для свиней. Специфічні кардіоваскулярні зміни спостерігаються при рівні фумонізину 150-170 мг/кг і тривалому згодовуванні (понад 100 діб).

Токсикоз птиці, викликаний фумонізином, був описаний в 1995 році. При вмісті фумонізину на рівні 8-16 мг/кг спостерігають у несучок зниження продуктивності, крововиливи у залозистому шлунку та накопичення рідини у кишечнику. Фумонізин найчастіше виявляється у кукурудзяному зерні і виробляється F. moniliforme. Найбільш поширеними із них є фумонізини B_1 та B_2. Другим за значенням продуцентом фумонізину є F. proliferatum.

Діагностика мікотоксикозів

Діагностика мікотоксикозів була, є, і буде залишатися комплексною. Тривалий час про наявність мікотоксинів судили за результатами мікологічних досліджень. Проте, присутність грибів, навіть токсиноутворюючих, не повинна автоматично пов'язуватись із контамінацією відповідними мікотоксинами, оскільки це багатофакторний процес. Навпаки, відсутність грибів на кормах зовсім не гарантує відсутності мікотоксинів, оскільки гриби могли загинути, тоді як мікотоксини володіють достатньо високою стійкістю.

Корми можуть бути контаміновані одночасно декількома мікотоксинами, що можуть вироблятися одним і тим же штамом. Моніторингові дослідження зразків зерна різних видів і продуктів його переробки показують, що понад 50% зразків містять мікотоксини і, в переважній більшості, в різних комбінаціях. Особливо це стосується токсинів, які продукуються грибами роду Fusarium. Тому необхідно визначати вміст окремих мікотоксинів, що дасть об'єктивну оцінку як за їх вмістом, так і за можливою контамінацією іншими токсичними факторами, які є спорідненими до цих токсинів або їх метаболітами.

Існують певні труднощі в діагностиці мікотоксикозів шляхом кількісного визначення мікотоксинів в кормах. Пояснюється це «вогнищевістю» росту грибків: вони найчастіше зустрічаються в місцях протікання, конденсації вологи, в глибині буртів тощо. Тому на перше місце виходить суворе дотримання правил відбору зразків зерна та комбікорму для досліджень, що має забезпечити репрезентативність вибірки.

Подібні особливості поширення грибків можуть викликати прояв мікотоксикозів лише в окремих станках, що може ввести в оману внаслідок відсутності масовості отруєння. Враховуючи це, останнім часом розробляється концепція оцінки безпосереднього вмісту мікотоксинів у біологічних субстратах тварин. Залежно від періоду напіврозпаду або напіввиведення мікотоксину можна реально побачити наявність мікотоксинів, їх поширеність та припустити ступінь дії на організм птиці за концентрацією в сироватці крові, печінці, нирках тощо.

В даний час існує ряд інструментальних методів кількісного визначення мікотоксинів в кормах та біологічних субстратах. Найбільш поширеними з них в даний час є методики з використанням тонкошарової хроматографії (ТШХ), високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), газової хроматографії (ГХ), мас-спектрометрії (МС) і їх поєднань.

Методи ТШХ доступні майже для всіх мікотоксинів. Виявлення і специфічна ідентифікація розроблена для кожного окремого мікотоксину. Головними недоліками тонкошарової хроматографії є низька продуктивність, складна пробопідготовка та низька чутливість (концентрація аналіту має бути в діапазоні 0,01-0,1%). В принципі, на сьогоднішній день ТШХ варто розцінювати як метод, який навряд чи можна назвати основним. Навпаки, його слід обирати за умови, коли відсутня можливість зробити дослідження адекватними методами.

Методи ВЕРХ для дослідження мікотоксинів широко поширені через їх переважаючі характеристики і надійність порівняно з ТШХ. Крім того, межа чутливості методів ВЕРХ із застосуванням різних детекторів може доходити до 1 мкг/кг зразку. Крім того, вони рекомендовані інструктивними документами, в тому числі, директивами ЄС.

У літературі повідомлялося про розробку методів ВЕРХ для одночасного аналізу декількох мікотоксинів. Особливо успішно таким чином аналізуються трихотеценові мікотоксини.

На практиці для дослідження кормів в польових умовах, умовах виробничих і випробувальних лабораторій потрібні методи, що дозволяють кількісно і швидко досліджувати велику кількість зразків на наявність мікотоксинів.

Усім цим характеристикам відпо-

відають методи на основі імунологічних реакцій. Комерційно доступні імунологічні методи для аналізу мікотоксинів базуються на застосуванні специфічних моноклональних та поліклональних антитіл до певних токсинів. Найчастіше мова йдеться про імуноферментний аналіз (ІФА).

ІФА зазвичай використовується для моніторингу наявності мікотоксинів вище певного рівня (або їх відсутності) у зразку. В даний час доступний ряд якісних, напівкількісних і кількісних методів.

Організація аналізу мікотоксинів у кормах цим методом можлива мінімальними засобами і в самі короткі терміни. Простота експлуатації та незначна вартість необхідного обладнання вигідно відрізняють ІФА від хроматографічних методів аналізу і роблять його особливо привабливим для лабораторій з обмеженими фінансовими можливостями.

На ринку доступні комерційні набори ІФА для визначення вмісту мікотоксинів як в кормах, так і в тваринницькій продукції. Серед них найбільш відомими виробниками є r-biopharm, Neogen, Tecna тощо. На нашу думку, серед них остання є новою для України, достатньо чутливою і специфічною, а також володіє оптимальним співвідношенням ціна-якість.

Профілактика

Токсикогенні гриби, хочемо ми того чи не хочемо, є невід'ємною частиною агроекологічної системи, а тому вони присутні на всіх стадіях виробництва, транспортування, переробки, виготовлення і використання кормів. Тому необхідно проводити постійний моніторинг щодо вмісту мікотоксинів у зернових та готових комбікормів і відстежувати його зміни в процесі зберігання.

Профілактику мікотоксикозів варто починати ще при плануванні посіву зернових, намагаючись максимально очистити поля від пожнивних залишків, які містять велику кількість грибів роду Fusarium. Ураження колосся спостерігається внаслідок життєдіяльності F. graminearum Schwabe. В основному, цим грибом синтезується ДОН, який накопичується, як правило, в зерні пшениці, а його концентрація може досягати 1 г/кг. Затримка зі збиранням врожаю призводить до ураження зерна F. sporotrichioides, що спричинює контамінацію зерна кількома мікотоксинами.

Після зібрання урожаю обов'язково необхідно встановити початковий вміст мікотоксинів, оскільки на їх утворення впливають вологість і час зберігання до сушки. Для попередження життєдіяльності грибів свіжозібране зерно просушують до вологості 13-15%, а потім охолоджують. Коли висушити зерно відразу після збирання неможливо, можна застосовувати хімічні консерванти, як правило, це низькомолекулярні органічні кислоти (бензойна, мурашина, оцтова тощо).

При підтвердженні наявності мікотоксинів у кормах постає питання їх детоксикації. Здійснюється вона різними шляхами. Найчастіше застосовують метод розбавлення, коли заражене або контаміноване зерно змішують з доброякісним. Інколи використовують руйнування мікотоксинів шляхом обробки кормів розчинами кислот чи лугів, але через агресивність цих речовин він застосовується рідко. Найбільш практичним засобом детоксикації є застосування сорбентів, які обмежують надходження мікотоксинів в організм із уже зараженого корму.

Мікосорбенти, як правило, виробляються на основі мінеральних речовин: використовуються або чисто мінерали, або їх композиція з органічними кислотами або екстрактами рослин. Із цієї умовної класифікації виключенням є лише «Мікосорб», що містить у якості діючої речовини маннанолігосахариди.

Враховуючи, що застосування мікосорбентів є практично єдиним легкодоступним засобом профілактики мікотоксикозів, а на сучасному ринку їх пропонується більше 10, серед фахівців постає логічне питання – а який же з них обрати? Адже майже всі виробники декларують 100%-ну сорбційну здатність. Проте, чи це так?

В нашому НДЦ розроблено схему оцінки якості мікосорбентів з урахуванням численних факторів:

1. його сорбційної здатності до окремих мікотоксинів in vitro в умовах, що експериментально відтворюють різні відділи травного тракту;
2. вплив сорбенту на рівень мікотоксинів в сироватці крові та органах-мішенях мікотоксину;
3. зміни біохімічних показників, що є маркерними за окремих мікотоксикозів;
4. виявлення сорбції вітамінів із комбікормів, що притаманне багатьом сорбентам.

На наше тверде переконання, лише за такої схеми враховуються не лише сорбція мікотоксинів адсорбентом в умовах in vitro, але й конкретні умови виробництва, де може спостерігатися асоціація різних токсинів, їх синергічна дія, а також сорбція поживних речовин раціону. І якщо перший етап, залежить лише від того, наскільки виробник дотримується рецептури під час виготовлення сорбенту, то інші, фактично, непередбачувані і є унікальними для кожного підприємства. Тому дослідження, що проводяться в нашому центрі, дають змогу встановити ефективність застосування мікосорбентів як в умовах in vitro, так і з врахуванням виробничих особливостей кожного підприємства.

Отже, мікотоксикози завдають значних збитків тваринництву, причому навіть наявність незначної кількості токсину може спричинювати відчутні приховані витрати. Надійним і фактично єдиним шляхом контролю за мікотоксикозами є їх визначення як в кормах, так і біологічних субстратах, що об'єктивно має здійснюватися методами ВЕРХ.

Профілактика мікотоксикозів повинна ґрунтуватися на багатьох чинниках, серед яких застосування адсорбентів є найбільш доступним, а при вивченні їх в НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсівАПК розроблено схему оцінки з урахуванням дії виробничих факторів.

Список використаної літератури

1. *Котик А.Н. Микотоксикозы птиц / А.Н. Котик. – Борки, 1999. – 268 с.*
2. *Профилактика микотоксикозов животных / Б.Н. Хмельницкий, З.И. Пилипец, Л.С. Малиновский и др. – М.: Агропромиздат, 1985. – 271 с.*
3. *Експертиза та контроль якості продуктів харчування / П.М. Гаврилін, О.Г. Прокушенкова, В.Г. Єфімов [та ін.] – Дніпропетровськ, 2012. – 198 с.*
4. *Брезвін О.М. Контроль мікотоксинів та їх знешкодження / О.М. Брезвін. – Автореф. дис. … д.вет.н.: 16.00.04 – ветеринарна фармакологія та токсикологія. – Львів, 2012. – 36 с.*