

DOI 10.35694/YARCX.2020.52.4.010



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

Е.М. Панковец

магистр ветеринарных наук, аспирант кафедры  
анатомии животных

А.Л. Лях (фото)

к.в.н., доцент кафедры анатомии животных

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная  
академия ветеринарной медицины»,

г. Витебск

*Иммуноферментный  
анализ, органы,  
ткани, биологические  
жидкости,  
пробоподготовка,  
экстракция*

*Enzyme immunoassay,  
organs, tissues, biological  
fluids, sample processing,  
extraction*

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 микотоксинов является защитно-приспособительным механизмом, который направлен на выживание плесневых грибов в неблагоприятных для них условиях. Широкомасштабная работа, связанная с внедрением различных способов снижения контаминации плесенью растительного сырья в процессе выращивания на полях, усовершенствование технологии заготовки и хранения зерновых и объёмистых кормов, а также использование сорбентов [1; 2; 3], 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 остаётся проблема скрытых микотоксикозов [4], а также определение концентрации микотоксинов в органах лабораторными методами, особенно на фоне постоянного попадания в организм микродоз различных микотоксинов [5]. Иммуноферментный анализ – это лабораторный метод диагностики, который основан на принципе связывания антигена (в данном случае микотоксина), со специфическим антителом (иммуноглобулином). Использование иммуноферментного анализа 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 определённым 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. 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 [6; 7; 8]. В последние годы учёными всего мира проводится анализ микотоксинов в биологических образцах [9]. 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 распространённые исследования были сосредоточены на разработке методов определения микотоксинов. Это связано с высокими требованиями к чувствительности тестов для определения микотоксинов, учитывая, как правило, крайне низкие уровни микотоксинов в биологических образцах [9]. 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 [10; 11].

В 2017 году учёные из лаборатории токсикологии и химии продуктов питания в Испании провели обзор исследований, проведённых в течение последнего десятилетия и посвящённых методам обнаружения микотоксинов в тканях и биологических жидкостях животных и человека [9]. В данной статье отражены основные методы экстракции, из которых наиболее часто использовались жидкостно-жидкостная экстракция (24%), твёрдофазная 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%), использовались и 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 загрязнённой диеты (250 мкг ОТА/кг корма) в течение 4 недель. После убоя на 28-й 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 ELISA и ВЭЖК. Для определения ОТА методом ELISA проводилась гомогенизация отобранных органов, экстракция этилацетатом [12] с центрифугированием с гидрокарбонатом натрия. В конце полученная надосадочная жидкость нагревалась на водяной бане при 100°C 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 селезёнке, печени, лёгких 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 путём попадания микотоксина в организм [14; 15].

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 у человека использовались легкодоступные биологические матрицы, такие как моча или кровь, причём моча была предпочтительна за счёт неинвазивного отбора проб [16]. Исследования по биомониторингу микотоксинов часто проводились практически во всём мире, включая Нигерию [17], Турцию [18], Бельгию [19; 20], Испанию [21], Германию [22; 23; 24], Италию [25; 26], Австрию [27], Чешскую Республику [28; 29], Иран [30] и Китай [31].

### Вывод

Основываясь на данные литературных источников, 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 легковыполнимую 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» [Текст] / О.М. Брезвин, З.А. Гута // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»: научно-практический журнал. – 2016. – Т. 52. – Вып. 1. – С. 110–113.
2. Крайнова, А.В. Адсорбционная эффективность кормовой добавки «МинезелMin-d-Gel» по отношению к продуктам гриба *Aspergillus* – афлатоксину / А.В. Крайнова, М.А. Гласкович // Студенты – науке и практике АПК: материалы 103-й Международ. науч.-практ. конф. студентов и магистрантов; Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск: ВГАВМ, 2018. – Ч. 1: Ветеринарная медицина. – С. 239–241.
3. Микулич, Е.Л. Морфологические перестройки почек и печени свиней при кормовых микотоксикозах и при добавлении адсорбента микотоксинов «Фунгинорм» / Е.Л. Микулич, В.И. Бородулина // Современные проблемы и перспективы исследований в анатомии и гистологии животных: материалы Международ. науч.-практ. конф., посвященной памяти профессора Д.Х. Нарзиева; Витебская государственная академия ветеринарной медицины, Самаркандский институт ветеринарной медицины. – Витебск: ВГАВМ, 2019. – С. 129–131.
4. 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. – 2015. – Т. 51. – Вып. 1. – Ч. 1. – С. 37–41.
5. Великанов, В.В. Диагностика и профилактика кормовых микотоксикозов у молодняка свиней [Текст] / В.В. Великанов, А.П. Курдеко // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2017. – № 2. – С. 26–29.
6. Ochratoxin A in raw materials and cooked meat products made from OTA-treated pigs [Text] / N. Perši [et al.] // Meat Science. – 2014. – Vol. 96. – № 1. – P. 203–210.
7. Preparation of a broad-spectrum anti-zearalenone and its primary analogues antibody and its application in an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay [Text] / G. Dong [et al.] // Food Chemistry. – 2018. – Vol. 247. – P. 8–15.
8. Turner, N.W. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review [Text] / N.W. Turner, S. Subrahmanyam, S.A. Piletsky // Analytica Chimica Acta. – Vol. 632. – № 2. – P. 168–180.
9. Studies on the Presence of Mycotoxins in Biological Samples: An Overview [Text] / L. Escrivá [et al.] // Toxins. – 2017. – Vol. 9. – № 251. – P. 1–33.
10. Natural Occurrence, Analysis, and Prevention of Mycotoxins in Fruits and their Processed Products [Text] / J. Yang [et al.] // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – Vol. 54. – № 1. – P. 64–83.
11. Zöllner, P. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry [Text] / P. Zöllner, B. Mayer-Helm // Journal of Chromatography. – Vol. 1136. – № 2. – P. 123–169.
12. Comparison of ochratoxin A levels in edible pig tissues and in biological fluids after exposure to a contaminated diet [Text] / J. Pleadin [et al.] // Mycotoxin Research. – 2016. – Vol. 32. – № 3. – P. 145–151.
13. Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens [Text] / K. Biró [et al.] // Avian Pathology. – 2002. – Vol. 31. – № 2. – P. 141–148.
14. Pestka, J.J. Immunochemical assessment of deoxynivalenol tissue distribution following oral exposure in the mouse [Text] / J.J. Pestka, Z. Islam, C.J. Amuzie // Toxicology Letters. – 2017. – Vol. 178. – № 2. – P. 83–87.
15. Amuzie, C.J. Tissue distribution and proinflammatory cytokine induction by the trichothecenedeoxynivalenol in the mouse: Comparison of nasal vs. oral exposure [Text] / C.J. Amuzie, J.R. Harkema, J.J. Pestka // Toxicology. – 2008. – Vol. 248. – № 1. – P. 39–44.

16. Mally, A. Biomonitoring of the mycotoxin Zearalenone: Current state-of-the art and application to human exposure assessment [Text] / A. Mally, M. Solfrizzo, G. H. Degen // Arch. Toxicol. – 2016. – Vol. 90. – P. 1281–1292.
17. Mycotoxin exposure in rural residents in northern Nigeria : A pilot study using multi-urinary biomarkers [Text] / C.N. Ezekiel [et al.] // Environ. Int. – 2014. – Vol. 66. – P. 138–145.
18. Ochratoxin A: Is it present in breast milk samples obtained from mothers from Ankara [Text] / A. Gürbay [et al.] // J. Appl. Toxicol. – 2009. – Vol. 30. – P. 329–333.
19. Assessment of mycotoxin exposure in the Belgian population using biomarkers: Aim, design and methods of the BIOMYCO study [Text] / E. Heyndrickx [et al.] // Food Addit. Contam. Part A. – 2014. – Vol. 31. – P. 924–931.
20. Human biomonitoring of multiple mycotoxins in the Belgian population: Results of the BIOMYCO study [Text] / E. Heyndrickx [et al.] // Environ. Int. – 2015. – Vol. 84. – P. 82–89.
21. Exposure assessment approach through mycotoxin/creatinine ratio evaluation in urine by GC-MS/MS [Text] / Y. Rodríguez-Carrasco [et al.] // Food Chem. Toxicol. – 2014. – Vol. 72. – P. 69–75.
22. Ali, N. Ochratoxin A and its metabolites in urines of German adults – An assessment of variables in biomarker analysis [Text] / N. Ali, N. Muñoz, G. H. Degen // Toxicol. Lett. – 2017. – Vol. 275. – P. 19–26.
23. Degen, G.H. Biomonitoring of ochratoxin A in grain workers [Text] / G.H. Degen, S. Mayer, M. Blaszkewicz // Mycotoxin Res. – 2007. – Vol. 23. – P. 88–93.
24. Evidence of ochratoxin A conjugates in urine samples from infants and adults [Text] / K. Muñoz [et al.] // Mycotoxin Res. – 2017. – Vol. 33. – P. 39–47.
25. Solfrizzo, M. Assessment of Multi-Mycotoxin Exposure in Southern Italy by Urinary Multi-Biomarker Determination [Text] / M. Solfrizzo, L. Gambacorta, A. Visconti // Toxins. – 2014. – Vol. 6. – P. 523–538.
26. Zearalenone screening of human breast milk from the Naples area [Text] / F. Massart [et al.] // Toxicol. Environ. Chem. – 2016. – Vol. 98. – P. 128–136.
27. Assessment of human deoxynivalenol exposure using an LC-MS/MS based biomarker method [Text] / B. Warth [et al.] // Toxicol. Lett. – 2012. – Vol. 211. – P. 85–90.
28. Comparison of ELISA and HPLC methods for determination of ochratoxin A in human blood serum in the Czech Republic [Text] / V. Dohnal [et al.] // Food Chem. Toxicol. – 2013. – Vol. 62. – P. 427–431.
29. 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 [Text] / F. Malir [et al.] // Biomarkers. – 2013. – Vol. 18. – P. 673–678.
30. Occurrence of Ochratoxin A and Aflatoxin M1 in human breast milk in Sari [Text] / P. Afshar [et al.] // Food Control. – 2013. – Vol. 31. – P. 525–529.
31. A biomarker survey of urinary deoxynivalenol in China: The Shanghai Women's Health Study [Text] / P.C. Turner [et al.] // Food Addit. Contam. – 2011. – Vol. 28. – P. 1220–1223.

### **References**

1. Brezvin, O.M. Opredelenie sorbcionnoj aktivnosti kormovyh dobavok «HamekoToks» i «Ceolit» [Tekst] / O.M. Brezvin, Z.A. Guta // Uchenye zapiski uchrezhdenija obrazovanija «Vitebskaja ordena «Znak Pocheta» gosudarstvennaja akademija veterinarnoj mediciny»: nauchno-prakticheskij zhurnal. – 2016. – T. 52. – Vyp. 1. – S. 110–113.
2. Krajnova, A.V. Adsorbcionnaja jeffektivnost' kormovoj dobavki «MinezelMin-d-Gel» po otnosheniju k produktam griba Aspergillus – aflatoksinu / A.V. Krajnova, M.A. Glaskovich // Studenty – nauke i praktike APK: materialy 103-j Mezhdunarod. nauch.-prakt. konf. studentov i magistrantov; Vitebskaja gosudarstvennaja akademija veterinarnoj mediciny. – Vitebsk: VGAVM, 2018. – Ch. 1: Veterinarnaja medicina. – S. 239–241.
3. Mikulich, E.L. Morfologicheskie perestrojki poček i pečeni svinej pri kormovyh mikotoksikozah i pri dobavlenii adsorbenta mikotoksinov «Funginorm» / E.L. Mikulich, V.I. Borodulina // Sovremennye problemy i perspektivy issledovanij v anatomii i gistologii zhivotnyh: materialy Mezhdunarod. nauch.-prakt. konf. posvjashhennoj pamjati professora D.H. Narzieva; Vitebskaja gosudarstvennaja akademija veterinarnoj mediciny, Samarkandskij institut veterinarnoj mediciny. – Vitebsk: VGAVM, 2019. – S. 129–131.
4. Monitoring sodержanija mikotoksinov v kormah / I.N. Dubina [i dr.] // Uchenye zapiski uchrezhdenija obrazovanija «Vitebskaja ordena «Znak Pocheta» gosudarstvennaja akademija veterinarnoj mediciny»: nauchno-prakticheskij zhurnal. – 2015. – T. 51. – Vyp. 1. – Ch. 1. – S. 37–41.
5. Velikanov, V.V. Diagnostika i profilaktika kormovyh mikotoksikozov u molodnjaka svinej [Tekst] / V.V. Velikanov, A.P. Kurdeko // Veterinarnyj zhurnal Belarusi. – 2017. – № 2. – S. 26–29.
6. Ochratoxin A in raw materials and cooked meat products made from OTA-treated pigs [Text] / N. Perši [et al.] // Meat Science. – 2014. – Vol. 96. – № 1. – P. 203–210.

7. Preparation of a broad-spectrum anti-zearalenone and its primary analogues antibody and its application in an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay [Text] / G. Dong [et al.] // *Food Chemistry*. – 2018. – Vol. 247. – P. 8–15.
8. Turner, N.W. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review [Text] / N.W. Turner, S. Subrahmanyam, S.A. Piletsky // *Analytica Chimica Acta*. – Vol. 632. – № 2. – P. 168–180.
9. Studies on the Presence of Mycotoxins in Biological Samples: An Overview [Text] / L. Escrivá [et al.] // *Toxins*. – 2017. – Vol. 9. – № 251. – P. 1–33.
10. Natural Occurrence, Analysis, and Prevention of Mycotoxins in Fruits and their Processed Products [Text] / J. Yang [et al.] // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – Vol. 54. – № 1. – P. 64–83.
11. Zöllner, P. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry [Text] / P. Zöllner, B. Mayer-Helm // *Journal of Chromatography*. – Vol. 1136. – № 2. – P. 123–169.
12. Comparison of ochratoxin A levels in edible pig tissues and in biological fluids after exposure to a contaminated diet [Text] / J. Pleadin [et al.] // *Mycotoxin Research*. – 2016. – Vol. 32. – № 3. – P. 145–151.
13. Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens [Text] / K. Biró [et al.] // *Avian Pathology*. – 2002. – Vol. 31. – № 2. – P. 141–148.
14. Pestka, J.J. Immunochemical assessment of deoxynivalenol tissue distribution following oral exposure in the mouse [Text] / J.J. Pestka, Z. Islam, C.J. Amuzie // *Toxicology Letters*. – 2017. – Vol. 178. – № 2. – P. 83–87.
15. Amuzie, C.J. Tissue distribution and proinflammatory cytokine induction by the trichothecenedeoxynivalenol in the mouse: Comparison of nasal vs. oral exposure [Text] / C.J. Amuzie, J.R. Harkema, J.J. Pestka // *Toxicology*. – 2008. – Vol. 248. – № 1. – P. 39–44.
16. Mally, A. Biomonitoring of the mycotoxin Zearalenone: Current state-of-the art and application to human exposure assessment [Text] / A. Mally, M. Solfrizzo, G. H. Degen // *Arch. Toxicol.* – 2016. – Vol. 90. – P. 1281–1292.
17. Mycotoxin exposure in rural residents in northern Nigeria : A pilot study using multi-urinary biomarkers [Text] / C.N. Ezekiel [et al.] // *Environ. Int.* – 2014. – Vol. 66. – P. 138–145.
18. Ochratoxin A: Is it present in breast milk samples obtained from mothers from Ankara [Text] / A. Gürbay [et al.] // *J. Appl. Toxicol.* – 2009. – Vol. 30. – P. 329–333.
19. Assessment of mycotoxin exposure in the Belgian population using biomarkers: Aim, design and methods of the BIOMYCO study [Text] / E. Heyndrickx [et al.] // *Food Addit. Contam. Part A*. – 2014. – Vol. 31. – P. 924–931.
20. Human biomonitoring of multiple mycotoxins in the Belgian population: Results of the BIOMYCO study [Text] / E. Heyndrickx [et al.] // *Environ. Int.* – 2015. – Vol. 84. – P. 82–89.
21. Exposure assessment approach through mycotoxin/creatinine ratio evaluation in urine by GC-MS/MS [Text] / Y. Rodríguez-Carrasco [et al.] // *Food Chem. Toxicol.* – 2014. – Vol. 72. – P. 69–75.
22. Ali, N. Ochratoxin A and its metabolites in urines of German adults – An assessment of variables in biomarker analysis [Text] / N. Ali, N. Muñoz, G. H. Degen // *Toxicol. Lett.* – 2017. – Vol. 275. – P. 19–26.
23. Degen, G.H. Biomonitoring of ochratoxin A in grain workers [Text] / G.H. Degen, S. Mayer, M. Blaszkewicz // *Mycotoxin Res.* – 2007. – Vol. 23. – P. 88–93.
24. Evidence of ochratoxin A conjugates in urine samples from infants and adults [Text] / K. Muñoz [et al.] // *Mycotoxin Res.* – 2017. – Vol. 33. – P. 39–47.
25. Solfrizzo, M. Assessment of Multi-Mycotoxin Exposure in Southern Italy by Urinary Multi-Biomarker Determination [Text] / M. Solfrizzo, L. Gambacorta, A. Visconti // *Toxins*. – 2014. – Vol. 6. – P. 523–538.
26. Zearalenone screening of human breast milk from the Naples area [Text] / F. Massart [et al.] // *Toxicol. Environ. Chem.* – 2016. – Vol. 98. – P. 128–136.
27. Assessment of human deoxynivalenol exposure using an LC-MS/MS based biomarker method [Text] / B. Warth [et al.] // *Toxicol. Lett.* – 2012. – Vol. 211. – P. 85–90.
28. Comparison of ELISA and HPLC methods for determination of ochratoxin A in human blood serum in the Czech Republic [Text] / V. Dohnal [et al.] // *Food Chem. Toxicol.* – 2013. – Vol. 62. – P. 427–431.
29. 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 [Text] / F. Malir [et al.] // *Biomarkers*. – 2013. – Vol. 18. – P. 673–678.
30. Occurrence of Ochratoxin A and Aflatoxin M1 in human breast milk in Sari [Text] / P. Afshar [et al.] // *Food Control*. – 2013. – Vol. 31. – P. 525–529.
31. A biomarker survey of urinary deoxynivalenol in China: The Shanghai Women's Health Study [Text] / P.C. Turner [et al.] // *Food Addit. Contam.* – 2011. – Vol. 28. – P. 1220–1223.