

ИЗУЧЕНИЕ ДОЗОВОЙ, ЛИНЕЙНОЙ И ВОЗРАСТНОЙ ЗАВИСИМОСТИ ЭФФЕКТОВ ФУМОНИЗИНА В1 *IN VIVO* В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ НА МЫШАХ

Аристархова Т.В.¹, Вагида М.С.², Мартынова Е.А.¹

¹ – ГУ НИИ питания РАМН

² – РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН

Москва

Фумонизин В1 (FB1) является вторичным метаболитом плесневых грибов рода *Fusarium moniliforme*, *proliferatum* и других. В настоящее время эксперименты по влиянию FB1 проводятся преимущественно, на мышах, крысах и обезьянах. Использование линейных мышей в этих целях имеет преимущество по сравнению с другими животными, в частности, используется меньший объем реактивов, больший выбор линий с точечными мутациями, что позволяет изучать тонкие механизмы действия FB1. Однако существует ряд проблем, касающихся возраста и пола животных, а также выбора той или иной линии.

Целью данной работы было проведение сравнительного исследования ответа мышей линий BALB/c, CBA, C57Bl/6 и DBA разного возраста и пола на однократное внутрибрюшинное введение фумонизина В1. Так как нашими работами было показано, что эффекты FB1 проявляются уже в дозе 1 мкг на мышь, то в данной работе мы использовали дозы от 0,01 мкг до 5,00 мкг на 1 г веса животных. В качестве возрастных ступеней были выбраны 4 недели, 8 недель, 12 недель, 6 месяцев и 14 месяцев. Все животные получали стандартный гранулированный рацион согласно ГОСТ, воду *ad libitum*, в течение всего эксперимента соблюдался 12-часовой режим освещения и требования тишины в помещении вивария. Эффекты FB1 исследовались в отработанной ранее модели по определению экспрессии рецепторов (маркеры активации) и внутриклеточных белков (стрессовые белки, цитокины и др.) на клетках тимуса, селезенки, печени и мозга мышей, а также определению процента спонтанного и индуцированного апоптоза. При изучении индуцированного апоптоза первичные культуры клеток, выделенных из тимуса, селезенки, печени или мозга мышей, были инкубированы в полной среде RPMI-1640 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки в течение 2,5 часов при температуре +37⁰С и 5% CO₂ в водяном термостате. В качестве агента, индуцирующего апоптоз, был использован С2-церамид в концентрации 20 микроМоль. Временные точки исследования были через 2,5 часа (срок появления признаков активации или апоптоза лимфоцитов), через 24 часа и 96 часов (пик первичного иммунного ответа).

В результате проведенных экспериментов было установлено, что наиболее чувствительными к действию FB1 из изученных нами линий мышей являются BALB/c > C57Bl/6 > DBA > CBA. Самки более чувствительны по изучаемым параметрам по сравнению с самцами. Наиболее интересные результаты получены для доз FB1. Минимальной действующей дозой в наших экспериментах была доза 0,02 мкг на 1 г веса самок BALB/c. Многочисленные эксперименты показали, что имеется бимодальная зависимость действия FB1 в указанном выше промежутке введенных доз токсина. Первый максимальный пик активности по изученным параметрам приходится на дозу 5 мкг на мышь (~ 0,25 мкг на 1 г веса животного). Следующий пик приходится на 20 – 25 мкг на мышь (~ 1,0 – 1,25 мкг на 1 г веса животного) в зависимости от линии мышей. Дозы свыше 50 мкг на мышь являются токсичными, что приводит к резкому снижению клеточной массы, нарушению межклеточных взаимодействий и т.д. Возраст животных имеет принципиальное значение, так как рост мышей происходит до 8 недель и еще формируется иммунная система. Наиболее чувствительными к действию FB1 были мыши до 6 недель и старые самки в возрасте 14 месяцев. Между мышами в возрасте 3 и 6 месяцев не регистрировалось существенных различий по изучаемым показателям. При исследовании органов мышей на 4 сутки после введения FB1 было обнаружено снижение клеточной массы на пиках активности токсина. На клеточном уровне это проявлялось повышением процента спонтанного и церамид-индуцированного апоптоза, что носило дозо-зависимый характер.

Выводы. Эффекты фумонизина В1 на мышах, связанные с его влиянием на рецепторы плазматической мембраны, активацию клеток иммунной системы, экспрессию стрессовых белков и с синтезом некоторых цитокинов носят бимодальный характер с пиками активности при дозах 5 мкг и 20 мкг на мышь. Наиболее чувствительными к действию фумонизина являются самки линии

BALB/c. Наиболее резистентными являются мыши линии СВА. Максимальный эффект фумонизина В1 проявляется у старых мышей в возрасте более 1 года.

К ВОПРОСУ О РАДИАЦИОННОЙ ОПАСНОСТИ ПРИ ЗАГОТОВКЕ СЪЕДОБНЫХ ГРИБОВ

О.А. Барсуков¹, А.И. Иванов^{2,4}, М.А. Плотников^{3,4}

1 – Пензенский государственный педагогический университет

2 – ФГОУ ВПО Пензенская государственная сельскохозяйственная академия

3 – Пензенский государственный университет

4 – РЦГЭКиМ по Пензенской области

Пенза

До последнего времени большинство работ, посвященных проблеме радиоактивного загрязнения дикорастущего грибного сырья, заготавливаемого на территории Российской Федерации, ограничивалось изучением накопления в их плодовых телах ^{137}Cs и ^{90}Sr . Эти исследования проводились преимущественно в районах, затронутых последствиями аварии на Чернобыльской АЭС. Однако, радиационная опасность, связанная с употреблением в пищу некоторых видов грибов не ограничивается накоплением указанных элементов.

В период с 1945 г. различными государствами было осуществлено более 400 ядерных взрывов в атмосфере, в результате которых в биогенный круговорот химических элементов включился ^{241}Am (америций-241) - искусственный, трансурановый элемент семейства актиноидов. По сравнению с ^{137}Cs он имеет значительно больший период полураспада (500 лет) и откладывается в костной ткани с периодом полувыведения 60 лет. Период полураспада ^{137}Cs - 30 лет, период полувыведения из костной ткани около года. Помимо этого ^{241}Am обладает более высокой миграционной способностью. Рассматриваемый элемент образуется при ядерных взрывах, во время которых происходит его самопроизвольный синтез путем захвата нейтронов ядрами ^{235}U и ^{239}Pu .

Изучение содержания ^{241}Am в плодовых телах съедобных грибов проводилось на территории Пензенской области. Определение элементов осуществлялось на гамма-спектрометрическом комплексе СКС-50М. По каждому виду анализировалось не менее трех образцов плодовых тел и тех образцов почв из мест их сбора.

В результате исследований, проводившихся в Пензенской области, было установлено, что среднее значение ^{241}Am в почвах составляет $65,6 \pm 18$ Бк/кг. При этом в некоторых экотопах отмечены значительно большие показатели, в частности, в почвах торфяных болот – от 90 до 120 Бк/кг. Соответственно накопление ^{241}Am в плодовых телах грибов в этих условиях оказывается максимальным. Этому способствует не только высокое содержание элемента, но и низкие показатели рН. В связи с этим в условиях моховых болот и прилежащих к ним территорий не следует проводить заготовку грибов, тем более что здесь в ряде случаев регистрируются также максимальные концентрации ^{137}Cs и природных радионуклидов.

Кроме того, существует видовая специфичность накопления изучаемого элемента. Из 27 образцов различных видов съедобных грибов в наименьшей степени ^{241}Am накапливают белый гриб (*Boletus edulis*) - 164 ± 12 Бк/кг и подгруздок белый (*Russula delica*) - 58 ± 5 Бк/кг. Максимальное количество накапливает польский гриб (*Xerocomus badius*) – 7417 ± 601 Бк/кг, несколько уступает ему свинушка тонкая (*Paxillus involutus*) – 4429 ± 378 Бк/кг, высокое содержание отмечено также для зеленушки (*Tricholoma flavovirens*) – 3075 ± 163 Бк/кг, подгруздка чёрного (*Russula adusta*) – 1003 ± 79 Бк/кг и козляка (*Suillus bovinus*) – 527 ± 44 Бк/кг. Следует отметить, что козляк и польский гриб являются также активными адсорбентами нерадиоактивных токсических элементов [Костычев, 2009 г.]. В связи с этим мы не рекомендуем заготавливать и употреблять в пищу перечисленные виды грибов.

РАЗРАБОТКА ИММУНОХИМИЧЕСКОГО НЕИНСТРУМЕНТАЛЬНОГО ТЕСТ-МЕТОДА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОХРАТОКСИНА А В КРАСНОМ ВИНЕ

Белоглазова Н.В.¹., Горячева И.Ю.²., Русанова Т.Ю.².

1 – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

2 – Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского

Москва – Саратов

Микотоксины - вторичные метаболиты микроскопических грибов, отличающиеся высокой токсичностью, а в ряде случаев - мутагенным, канцерогенным и тератогенным действием, являющиеся сильными иммунодепрессантами.

Охратоксин А (ОТА) - один из наиболее опасных микотоксинов, он продуцируется *Aspergillus ochraceus* и *Penicillium viridicatum*. Кроме нефротоксичности он проявляет гепатоксические, тератогенные и канцерогенные свойства, в основном поражает почки и печень, приводит к злокачественному перерождению клеток. Это соединение образуется в продуктах питания при выращивании и хранении. Одним из возможных источников поступления ОТА в организм человека является его потребление вместе с красным вином.

Для определения ОТА в жидких пищевых продуктах (вине, виноградном соке и др.), как правило, используют высокоэффективную жидкостную хроматографию с различными видами детектирования. Хроматографические методы длительны и требуют использования дорогого оборудования; не могут быть использованы непосредственно на месте производства и переработки сельхозпродукции. В связи с этим развиваются методы быстрого и недорогого скрининга ОТА в пищевых продуктах, в частности, тест-методы, позволяющие проводить оценку наличия или отсутствия аналита в объекте на качественном уровне. Они просты, дешевы, доступны неспециалистам, не требуют дорогостоящих реактивов и оборудования, кроме того, они позволяют проводить анализ непосредственно на месте. Существенным недостатком широко распространенных иммунохроматографических и иммунофильтрационных тест-методов является ограниченная емкость сорбента, что приводит к их ограниченной чувствительности, и кроме того подверженность воздействию эффекта матрицы образца.

Колоночный тест - метод позволил объединить в одном цикле очистку образца, концентрирование и определение аналита. Результат определения фиксировали визуально: отсутствие окраски детектирующего слоя в случае присутствия анализируемого вещества выше контрольной концентрации и развитие окраски в случае его отсутствия. Интенсивность окраски напрямую зависела от концентрации определяемого вещества, так как молекулы конъюгата связывались с оставшимися свободными местами связывания антител, не занятыми ОТА.

Для определения ОТА использовали прозрачные трубки, в которые помещали очищающий и детектирующий слои. Детектирующий иммунослой представлял собой гель на основе сефарозы 4В с ковалентно связанными поликлональными кроличьими антителами. Для нивелирования матричного эффекта красного вина над аналитической колонкой с детектирующим иммунослоем помещали колонку, содержащую твердый сорбент (модифицированные силикагели). Была оптимизирована методика предварительной очистки красного вина. Далее были выбраны оптимальные условия определения ОТА данным методом (разведение конъюгата и геля с привитыми антителами, время детектирования, способ пропускания конъюгата и субстрата через колонку).

Оценены аналитические характеристики иммунохимического тест – метода. Экспериментально установлено, что метод позволяет детектировать присутствие ОТА в образце в концентрациях 2 нг/мл и выше, что отвечает законодательно установленному максимально допустимому содержанию ОТА, принятому Еврокомиссией.

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ АЛЬТЕРНАРИОЛА

Буркин А.А., Кононенко Г.П.

ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН
Москва

Альтернариол (АОЛ), метаболит широко распространенных на злаках микромицетов рода *Alternaria*, с момента его обнаружения (Raistrick et al., 1953) и по настоящее время находится в центре внимания многих исследователей. Причиной повышенного интереса явились многочисленные подтверждения его токсического действия в экспериментах на лабораторных животных, мутагенность, а также предполагаемая причастность *Alternaria* spp. к массовым интоксикациям населения и животных (Zhen et al., 1991; Haubruge et al., 2001). Применение хроматографического анализа позволило установить как выраженное продуцирование АОЛ видами, интенсивно поражающими агропродукцию, так и случаи его реального участия в загрязненности кормов и продовольствия (Gruber-Schley, Thalmann, 1988; Li, Yoshizawa, 2000). Для решения актуальной задачи расширения мониторинговых исследований необходимо создание менее затратных альтернативных методов, сочетающих высокую чувствительность и избирательность анализа с быстротой и простотой выполнения.

Нами впервые разработан непрямой иммуноферментный анализ на основе поликлональных кроличьих антител к конъюгату АОЛ с бычьим сывороточным альбумином, полученному в реакции формальдегидной конденсации. При синтезе иммуногена мольный избыток гаптена составил 110 молей/моль белка. Иммунный ответ активно развивался в первой фазе иммунизации до 3-его цикла введения иммуногена и затем оставался неизменным. Конкурентный анализ проводили с использованием иммобилизованных конъюгатов с желатином, бычьим сывороточным и яичным альбуминами, синтезированными при 10-кратном мольном избытке АОЛ. Перекрестная реактивность антител в отношении его ближайшего природного аналога - монометилового эфира АОЛ составила менее 1%. Снижение процента связывания антител ($76\pm 2\%$, $50\pm 3\%$, $24\pm 2\%$) имело линейный характер при равномерном возрастании значений логарифма концентраций калибровочных растворов АОЛ (0,0004, 0,002, 0,01 мкг/мл). В ходе анализа водно-ацетонитрильных экстрактов зерна, продуктов переработки пшеницы, кукурузы, сои, подсолнечника и кормосмесей сопутствующие вещества, в том числе и другие микотоксины (Т-2 токсин, дезоксиниваленол, охратоксин А), не создавали каких-либо препятствий функционированию тест-системы. Предел количественного определения АОЛ - 20 мкг/кг.

Встречаемость АОЛ в фуражном зерне кукурузы (5/47, 38-169 мкг/кг), пшеницы (1/16, 192 мкг/кг), ячменя (6/41, 20-55 мкг/кг), овса (9/19, 20-706 мкг/кг), ржи (1/8, 50 мкг/кг) составила в целом 16,8% (20-706 мкг/кг). Положительными в анализе были 3 образца пшеничных отрубей из 6 исследованных (38, 47 и 63 мкг/кг). Высокая распространенность АОЛ установлена для продукции переработки семян подсолнечника (жмыхи и шроты, 15/17, 25-388 мкг/кг) и зерна кукурузы («глютен» и «корм глютенный», 16/20, 20-190 мкг/кг). В полнорационных комбинированных кормах частота его обнаружения оказалась также весьма значительной (23/66), а уровни контаминации находились в диапазоне от 20 до 334 мкг/кг. Наиболее высокая загрязненность найдена в образцах сена и силоса – 560 и 760 мкг/кг, соответственно.

Таким образом, создание иммуноферментного анализа позволило получить первые масштабные сведения о характере контаминации АОЛ агропродукции, составляющей в нашей стране основу рационов для сельскохозяйственных животных. Видовая принадлежность грибов *Alternaria*, участвующих в загрязнении АОЛ зерновых, сочных и грубых кормов пока остается невыясненной. Оценка 18 изолятов *Alternaria* spp. из разных видов кормов (сусловый агар, 25°C, 7 сут) показала, что все они способны продуцировать этот метаболит и накапливать его в количествах от 7 до 700 мкг/мл среды.

МИКОФЕНОЛОВАЯ КИСЛОТА: РИСК КОНТАМИНАЦИИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ И КОРМОВ

Буркин А.А., Кононенко Г.П.

ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН

Москва

Для метаболитов микогенного происхождения известен чрезвычайно широкий спектр биологической активности - от антибиотического действия до разнообразных специфических эффектов на биохимические процессы. Микофеноловая кислота (МФК) обладает выраженным иммунодепрессивным действием и, наряду с циклоспорином А, мизорибиним и такролимусом, успешно используется в медицине при аллогенных трансплантациях (Allison, Eugui, 1993). Тот факт, что большинство грибов, способных активно продуцировать МФК – *Penicillium roqueforti*, *P.brevicompatum*, *P.puberulum*, *P.stoloniferum*, *Bysschlamus nivea*, широко распространены в пищевых продуктах и кормах, вызывает вполне обоснованную тревогу у специалистов в области гигиены питания и безопасности кормления животных.

Цель данной работы – изучение состояния контаминации МФК пищевых продуктов и кормов в нашей стране с применением метода непрямого конкурентного иммуноферментного анализа. Высокоактивные кроличьи антитела были получены на конъюгат бычьего сывороточного альбумина и МФК после 20-часовой предварительной активации карбоксильной функции гаптена N-гидроксисукцинимидом в присутствии карбодиимида. Наилучшие характеристики анализа были получены при использовании в качестве твердофазного антигена гомологичного по методу синтеза конъюгата МФК и яичного альбумина. По результатам оптимизации процедуры пробоподготовки чувствительность определения МФК в напитках брожения составила 0,2 нг/мл, в кормах - 20 мкг/кг.

Выборочная оценка напитков брожения (пиво, квас) показала значительную степень их загрязненности - МФК была обнаружена в 40 из 42 образцов в концентрациях от 0,2 до 5,0 нг/мл (Буркин, Кононенко, 2008). Причиной этого, по-видимому, является неконтролируемый рост продуцирующих грибов на различных этапах технологического процесса приготовления напитков. За период 2007-2008 гг. нами проведено обследование состояния 180 образцов кормового сырья и 294 образцов полнорационных комбикормов и концентратов, использованных на животноводческих предприятиях нашей страны. Частота обнаружения МФК в комбикормах и концентратах составила 11,9%. Большинству положительных образцов (33/35) были свойственны количества от 20 до 63 мкг/кг (в среднем 30 мкг/кг) и только 2 из них имели больший уровень загрязненности - 109 и 832 мкг/кг. По выборке из 113 образцов фуражного зерна контаминация МФК составила 8% с варьированием от 32 до 629 мкг/кг, у пшеницы (3/55, 35, 77, 80 мкг/кг), ячменя (2/37, 89, 116 мкг/кг), кукурузы (4/21, 32-629 мкг/кг). МФК присутствовала в 3/17 образцов жмыха и шрота из подсолнечника в количествах 37, 79 и 120 мкг/кг, в 2/7 образцов «глютена кукурузного» (50, 69 мкг/кг) и не была обнаружена в соевом шроте (0/26), пшеничных отрубях (0/7) и горохе (0/10). В целом, загрязненность зерновых кормов МФК была слабо выраженной. Среди всех видов исследованных кормов, как правило, контаминированных несколькими микотоксинами, были найдены «нулевые» образцы, что свидетельствовало о высокой избирательности анализа. Уровни содержания более 100 мкг/кг найдены нами в единичных исследованных пробах сочных кормов (силос, сенаж), что вполне объяснимо особым составом их микобиоты, включающей активные продуценты МФК (*Penicillium roqueforti* и *Bysschlamus nivea*).

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ФУМОНИЗИНОМ В1

Вагида М.С., Мартынова Е.А.

РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН

ГУ НИИ питания РАМН

Москва

Иммуномодулирующий эффект микотоксина фумонизина В1 (FB1), продуцируемого микроскопическими плесневыми грибами рода *Fusarium moniliforme, proliferatum* и другими родственными видами, был ранее показан нашими работами. В частности, было установлено, что фумонизин В1 активирует нейтральную сфинголиелиназу плазматической мембраны лимфоцитов, что обуславливает изменение сигнала от антиген-специфического рецептора Т-лимфоцитов (TCR/CD3 комплекса). Также было показано, что фумонизин В1 активирует протеинфосфатазу CD45, сопряженную с TCR/CD3 комплексом, изменяет экспрессию ко-рецепторов CD4, CD8 и CD25. Однако до настоящего времени не было проведено полноценных исследований, касающихся влияния фумонизина В1 на ко-стимулирующие сигналы, в частности, от рецептора CD28, сопряженного с активностью кислой сфингомиелиназы, а также от молекул адгезии CD44, CD54, LFA-1 и других, участвующих в амплификации сигнальных путей, предающих информацию от иммунологического синапса при распознавании антигена. *Целью данного исследования* было изучение ранее неизвестных механизмов, связанных с проведением аксессуарных сигналов, необходимых для нормального развития иммунного ответа. Работа проведена *in vivo* и *in vitro*. Были использованы первичные культуры клеток тимуса и селезенки мышей линий BALB/c, C57Bl6, CBA, DBA. Мышам этих линий фумонизин В1 также вводился внутриперитонеально однократно в дозах от 1 до 20 мкг токсина на мышь, дозы выбраны с учетом показанной ранее эффективности в отношении лимфоцитов мышей. С помощью моноклональных антител на проточном цитометре FACSCalibur (Beckton Dickinson, USA) была определена экспрессия рецепторов CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD44, CD45, CD54, CD69, CD71, TNF-R1, TNF-R2, ICAM-1 и LFA-1. *Результаты.* Установлено, что фумонизин В1 оказывает дозозависимое влияние на экспрессию аксессуарных молекул, проводящих дополнительный сигнал при активации лимфоцитов. Снижается процент клеток, несущих рецепторы CD28, а также плотность этих рецепторов на плазматической мембране лимфоцитов. Наиболее выраженный эффект фумонизин В1 оказывает на Т-лимфоциты селезенки, более зрелые по сравнению с клетками тимуса. Экспрессия CD28 изменяется также на В-лимфоцитах селезенки, что установлено по двойному окрашиванию с антителами B200. Нарушение проведения сигнала от рецептора CD28 сопряжено с нарушением активации кислой сфингомиелиназы. Это приводит к недостаточному распаду сфингомиелина и снижению уровня церамида, необходимого для изменения фазового состояния липидного бислоя плазматической мембраны и формированию липидных рафтов, содержащих полный набор киназ и фосфатаз, участвующих в проведении сигнала от антиген-специфического рецептора. Экспрессия активационных антигенов CD25, CD69 и CD71 снижается дозозависимо при контакте лимфоцитов с фумонизином В1 *in vivo* и *in vitro*. Это отражает нарушение ранних этапов иммунного ответа после распознавания антигена и подтверждается нашими данными по снижению первичного иммунного ответа на Т-зависимые антигены. Фумонизин В1 нарушает экспрессию рецептора CD44, критически необходимого для созревания тимоцитов, а на более поздних стадиях дифференцировки, а также на зрелых клетках селезенки, работающего как молекула адгезии. Фактор некроза опухоли (TNF- α) является плейотропным цитокином иммунной системы. Соотношение рецепторов TNF-R1 (p55) и TNF-R2 (p75) существенно изменяется под влиянием фумонизина В1. Если для TNF-R1 нами было ранее выявлено влияние фумонизина, то для TNF-R2 впервые показано действие фумонизина на плотность рецепторов, процент TNF-R2-положительных клеток, а также особенности взаимодействия токсина и рецепторов при различных состояниях клеток и при контакте с антигеном. Наиболее выраженное влияние фумонизин оказывает на тимоциты, в которых нарушение экспрессии рецепторов, связанных с активацией, приводит к активационно-индуцированному апоптозу. Мы установили, что фумонизин повышает уровень экспрессии ингибиторов клеточного цикла p21 и p27, изменяет экспрессию белка Rb протеина и циклина D1, что приводит к остановке клеточного цикла тимоцитов и повышению процента гибели клеток.

Нарушение процессов активации Т-лимфоцитов обуславливает снижение процента антитело-образующих клеток селезенки в ответ на контакт с Т-зависимыми антигенами. *Выводы.* Фумонизин В1 дозо-зависимо влияет на активацию лимфоцитов, что наиболее выражено на делящихся клетках тимуса. Это приводит к нарушению первичного иммунного ответа на Т-зависимые антигены.

GEOTRICHUM CANDIDUM В МИКРОБИОТЕ ЗЕРНА ПИВОВАРЕННОГО СОЛОДА

Волкова Т.Н.

*ГУ ВНИИ пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности РАСХН
Москва*

Микологический анализ образцов солода разных производителей, главным образом, отечественных и некоторого количества зарубежных, проводившийся в течение 15 лет, показал, что в процессе соложения микробиота зерна претерпевает существенные изменения как в отношении видового состава микромицетов, так и в количественном отношении.

Микробиота свежееубранного зерна ячменя представлена преимущественно полевыми грибами, среди которых доминируют (в порядке убывания) альтернария, биполярис, эпикококк, фузариум, кладоспориум; грибы хранения отсутствуют или встречаются в незначительном количестве; эпифитные дрожжи присутствуют ограниченно.

Для зерна свежееотсушенного солода характерна так называемая микробиота соложения, состоящая из аэробных и факультативно-анаэробных, часто имеющих мицелиальную форму дрожжей родов *Pichia*, *Candida*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Brettanomyces*, *Saccharomyces* и др., а также дрожжеподобных микромицетов *Geotrichum candidum* («молочная плесень») и *Aureobasidium pullulans* («черные дрожжи»). Полевые грибы на зерне солода сохраняются в незначительном количестве. К завершению процесса соложения наблюдается инфицирование зерна мукоровыми грибами: *Rhizopus nigricans*, *Mucor hiemalis*, *M. racemosus*, *M. circinelloides* и др. Контаминация зерна солода грибами хранения – пенициллами и аспергиллами – свидетельствует о неблагоприятности санитарно-гигиенических условий процесса соложения. Микробиота солода отличается от микробиоты ячменя также и гораздо более высокой (на несколько порядков) инфекционной нагрузкой.

Geotrichum candidum Link всегда входит в состав микробиоты солода, хотя количество его варьирует в разных образцах. Приблизительно в половине из них наблюдается 100%-ное заражение *G. candidum* с высокой инфекционной нагрузкой.

G. candidum нередко встречается в пищевых продуктах либо как часть нормальной флоры, например, в сырах, либо как контаминант (в молочных продуктах, овощах, цитрусовых, фруктовых соках), является также естественным и обычным компонентом микробиоты силоса (Engel, 1986). *G. candidum* - распространенный вредитель пивоваренного производства (на стадиях охлаждения и аэрации сушла).

Широкое распространение и кажущаяся безопасность *Geotrichum candidum* позволили некоторым исследователям (Voivin & Malanda, 1993; 1997) использовать этот организм в качестве конкурента фузариума и грибов хранения в процессе соложения. Основываясь на лабораторных и промышленных экспериментах, авторы утверждали, что добавление конкретного штамма *G. candidum* в воду, применяемую для замачивания ячменя, ингибирует развитие дрожжей, фузарий и других нежелательных мицелиальных грибов, при этом снижается содержание фузариозных микотоксинов дезоксиниваленола и зеараленона.

Однако, *G. candidum* известен и как условно патогенный организм, возбудитель геотрихозов, он отнесен к IV группе патогенности (СП 1.2.731-99). Может вызывать бронхиальные и легочные инфекции, геотрихозы желудочно-кишечного тракта, стоматиты, а также поверхностные микозы у лиц с ослабленной иммунной системой (Gueguen, 1988; Саттон и др., 2001). *G. candidum* является продуцентом ряда токсических вторичных метаболитов: клавинов агроклавина и элимоклавина, лизергиновой кислоты, эргозина (El-Refai, Sallam, Naim, 1970), а также канцерогенных нитрозаминов и нитрозопиперидина, вызывающих рак пищевода (Lu et al., 1979; Li et al. 1987).

Следует ли относиться к присутствию *G. candidum* в составе микробиоты соложения как к нежелательному или даже опасному загрязнению, с которым необходимо бороться?

КАЧЕСТВО МЯСА ЖИВОТНЫХ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ Т-2 ТОКСИНА И ДЕЦИСА

Галютдинова Г.Г., Егоров В.И., Папуниди Э.К., Папуниди К.Х.

ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»

Казань

В настоящее время проблема микотоксинов приобрела глобальный характер в связи с нарушением экологического равновесия, на которое оказали влияние интенсивные технологии возделывания сельскохозяйственных культур, а также загрязнение окружающей среды.

Попадая с продуктами питания в организм человека и животных, микотоксины проявляют мутагенный, канцерогенный, иммунодепрессантный эффекты, вызывают аллергии, поражения печени и почек, органов воспроизводительной системы и др. Снижая титры антител, они повышают восприимчивость к заболеваниям.

Особую опасность в связи с широким распространением в природе и высокой токсичностью представляют трихотеценовые микотоксины, которые вызывают развитие у людей алиментарной токсической алейкии. Экологическим фактором этих токсикозов наиболее часто являются Т-2 токсин.

Одним из факторов увеличивающих опасность загрязненных кормов микотоксинами является возможное сочетание их с пестицидами.

В последние годы все более широкое применение находят инсектициды, относящиеся к группе синтетических пиретроидов. При сочетанном попадании данных токсикантов уже наблюдались случаи отравления людей, массовый падеж сельскохозяйственных животных (крупный рогатый скот, свиньи), уничтожение полезных организмов на пашнях.

В связи с участвовавшими случаями отравления синтетическими пиретроидами и Т-2 токсином, быстрым развитием клинической картины интоксикации, коротким сроком летального исхода или необходимостью вынужденного убоя, представляет практический интерес изучение вопросов распределения данных токсикантов в организме, сроки сохранения их в органах и тканях отравленных животных.

Исследования были проведены на овцах, получавших децис и Т-2 токсин (как отдельно, так и совместно) с кормом на уровне ПДК (0,01 и 0,1 мг/кг) в течение месяца. При определении остаточных количеств микотоксина и пиретроида в органах и тканях овец был использован метод газожидкостной хроматографии. Т-2 токсин был обнаружен в следовых количествах (0,001-0,0005 мг/кг).

Через 1 сут содержание дециса в почках составляло 1,23 мкг/кг, в мозге 0,84 мкг/кг, в печени, селезенке и легких \approx 0,1 мкг/кг, в сердце и мышцах 0,01 и 0,04 мкг/кг. На 14 сутки содержание дециса в исследуемых органах и тканях снизилось, а спустя месяц после убоя остаточные количества данного токсиканта в органах и тканях не были обнаружены.

При определении остаточного количества дециса в органах и тканях животных установили, что концентрация пиретроида была выше при совместном поступлении с Т-2 токсином. Т-2 токсин при совместном поступлении с децисом способствует более медленному выведению последнего из органов и тканей животных.

Ветеринарно-санитарная экспертиза мяса полученного от животных, отравленных децисом и Т-2 токсином при отдельном и сочетанном их поступлении на уровне предельно-допустимой концентрации на 2 сут исследования, хотя и имели отличия от аналогичных показателей мяса контрольных животных, но не выходили за пределы значений допустимых ГОСТом для свежего мяса. Однако на 10 сут хранения в мясе подопытных животных наблюдались первые признаки порчи, особенно в группе получавших совместно оба токсиканта.

Таким образом, можно отметить, что сочетанное воздействие децисом и Т-2 токсином оказывает неблагоприятное влияние на процессы хранения мяса, в результате которых оно теряет свою пищевую ценность.

МИКОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И ПРОФИЛАКТИКА МИКОТОКСИКОЗОВ

Гарасько Е.В., Поздышева Т.И., Гретченко Г.А., Морев С.И.

Ивановская государственная медицинская академия

Иваново

Обеспечение безопасности и качества питания населения России является важнейшей задачей на современном этапе развития пищевой индустрии. Микологические исследования пищевых продуктов направлены на профилактику микотоксикозов, связанных с употреблением в пищу контаминированных грибами продуктов питания. Достигается она благодаря контролю выпуска и реализации на пищевых объектах доброкачественных и безопасных в эпидемиологическом отношении продуктов.

Результаты исследований 6936 проб, выполненных испытательной микробиологической лабораторией ИвГМА за последние 5 лет, показали, что критериям безопасности качества пищевых продуктов не соответствовали 843 (12,2%) проб. В том числе: мясо и мясопродукты - 175 (20,8%); птица, яйца и продукты их переработки - 40 (4,8%); молоко и молочные продукты - 219 (26%); рыба, нерыбные объекты промысла и продукты, вырабатываемые из них - 67 (8%); кондитерские изделия - 146 (17,3%); масличное сырье и жировые продукты - 69 (8%); напитки - 23 (2,7%); продукция предприятий общественного питания, в том числе салаты - 23 (2,7%); другие - 81 (9,6%).

Плесневые грибы и дрожжи выявлены в 59 (1,51 %) проб, что несколько выше процента выделения потенциально патогенных (*S aureus*) - 35 (0,89%) и патогенных (*Salmonella*) - 29 (0,75%) микроорганизмов.

По группе микроорганизмов, характеризующих микробиологическую стабильность (дрожжи, плесневые грибы) чаще всего не соответствовали критериям безопасности: кондитерские изделия - 32 (4,45%) проб, салаты – 6 (0,72%) проб, шрот подсолнечный - 4 (0,48%) проб.

По группе потенциально патогенных (*S aureus*) чаще всего не соответствовали критериям безопасности рыбные продукты - 16 (5,34%) проб; по группе патогенных (*Salmonella*) - птица и продукты переработки - 24 (7,68%) проб;

Полученные данные способствовали своевременному проведению специальных мероприятий по выявлению и устранению конкретных факторов инфицирования продуктов питания и улучшению состояния санитарной культуры в пищевой индустрии.

В целом, за последние 5 лет отмечалась общая тенденция к снижению (в среднем на 3,5%) количества отрицательных показателей по критериям безопасности в динамике по годам с 14,2% до 13,2% и 11,9% - за 3 года и до 11,1% и 10,7% - в последние годы. Это свидетельствует о важности санитарно-микробиологического контроля и микологического исследования пищевых продуктов для профилактики микотоксикозов.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ И МИКОТОКСИНОВ В ЗЕРНОВЫХ

Гахраманова Ф.Х., Магеррамова С.И., Илясова М.Х., Меджнунова А.А.

Институт Микробиологии НАН Азербайджана

Баку, Азербайджан

Как известно, хлебобулочные изделия являются незаменимым компонентом пищевого рациона человека, в связи с чем, обеспечение населения такого рода качественным и экологически чистым продуктом, является всегда актуальной задачей, как теоретиков, так и практиков.

Производство хлебобулочных изделий является процессом, который происходит в несколько этапов. Однако каждый этап происходит в основном в открытой системе, где неизбежен контакт с микроорганизмами, результат которого в основном носит негативный характер. Это ярко выражается особенно в период созревания и при хранении зерна, так как, зерновая масса является полузамкнутой экологической системой, в которой микроорганизмы играют роль разрушителей и потребителей органических веществ и энергии, запасенных в зерне. Вызываемые микроорганизмами процессы порчи приводят к потерям сухих веществ зерна, ухудшению показателей его качества, безопасности и жизнеспособности.

В связи с этим, целью представленной работы было изучение закономерности распределения мицелиальных грибов и образующих ими токсинов на зерновых (пшеница, кукуруза и ячмень) культурах, возделываемых в условиях Азербайджанской Республики для производства хлебобулочных изделий.

В результате проведенных работ установлено, что при хранении разные группы и виды микроскопических грибов в соответствии со своими требованиями к факторам внешней среды, занимают определенные экологические ниши в зерновой массе. Это обусловлено, тем, что в зерновой массе, особенно самосогревающейся, создаются зоны с различными температурно-влажностными режимами и условиями аэрации, что способствует строгой локализации различных экологических групп микромицетов, среди которых имеются и токсинообразующие грибы р. *Aspergillus*, *Penicillium* и *Fusarium*. Так, в поверхностном слое с его высокой влажностью и умеренной температурой в зерне развиваются бактерии и грибы р. *Penicillium* и *Fusarium*. По мере перехода в более глубокие слои греющейся зерновой массы, температура достигает от 30⁰С до 50⁰ С, а влажность постепенно снижается. Здесь наблюдается последовательное развитие *A. candidus*, *A. nidulans*, *A. flavus* и виды р. *Mucor*. В центре очага самосогревания при максимальных температурах (до 55⁰С, иногда до 60⁰С) преобладают термотолерантные мукоровые грибы.

Установлено, что верхние слои (0-30 см) зерновых масс являются наиболее опасными с токсикологической точки зрения. Основные токсинообразующие грибы *A. flavus*, *A. glaucus*, *F. graminearum*, *F. moniliforme* и др. встречаются именно в этом слое. Кроме того, количество микотоксинов (афлатоксин, охратоксин, зеараленон, фумонизин) и численность грибов в этом слое также характеризуется более высокими показателями: 0,2 – 1,7 мк/кг и 53-60·10³ КОЕ/г, соответственно.

В ходе работы также установлено, что в отдельно взятой зерновке злаков также наблюдается определенная локализация токсигенных грибов и приуроченность образуемых ими микотоксинов к определенным анатомическим структурам зерна. Например, грибы из рода *Aspergillus* и *Penicillium* первоначально развиваются в оболочках, но затем проникают в зародыш и алейроновый слой, богатый белками, липидами и фосфолипидами. Эндосперм зерна, непосредственно из которого вырабатываются крупы и мука продовольственного назначения, являются с микологической и токсикологической точки зрения наиболее безопасной частью зерна.

К ВОПРОСУ О КОНТАМИНАЦИИ ОБНОЖКОВОЙ ПЫЛЬЦЫ ГРИБАМИ И МИКОТОКСИНАМИ

Григорян К.М., Бриндза Я., Саргсян М.П., Акобян Л.Л.

Ереванский государственный университет, кафедра ботаники

Институт биоразнообразия и биобезопасности

Ереван, Армения – Нитра, Словакия

Пыльца, собранная медоносными пчелами (обножковая пыльца), рассматривается как диетический продукт, который рекомендуется для использования в медицине. (Samochwiec and Wojcicki, 1981; Kosmoder et al., 1983; Liebelt et al., 1994; Cocan et al., 2005 ; Hamamoto et al., 2006). Особое внимание, с гигиенической точки зрения, в последнее время уделяется вопросам микробиологической безопасности обножковой пыльцы. Возможность управления микробиологическими опасностями в процессе производства и упаковки пыльцы, является важным условием, обеспечивающим отсутствие патогенных, условно-патогенных бактерий и мицелиальных грибов. В соответствии с Международными стандартами количество мицелиальных и дрожжевых грибов в обножковой пыльце не должно превышать 5×10^4 кое/г (Campos et al., 2008). Не менее важной проблемой является существование риска загрязнения пыльцы микотоксинами. Согласно Медина, Гонзалес (Medina, 2004; Gonzales et al., 2005) изучена естественная микобиота 90 образцов пыльцы. Отмечается, что наиболее часто встречаются дрожжевые грибы и грибы рода *Penicillium*. Авторами обнаружены в образцах пыльцы потенциальные продуценты микотоксинов – афлатоксинов и охратоксина А.

Целью нашего исследования явилось изучение состава мицелиальных грибов, контаминирующих обножковую пыльцу, полученную в основном со следующих видов растений подсолнечника (*Helianthus annuus*) и рапса (*Brassica napus*). Всего исследовано 35 образцов обножковой пыльцы, среди которых 24 получены из Словакии, 11 - являются местными. В результате микологического анализа выделено и идентифицировано 30 видов мицелиальных грибов, относящихся к 2 классам (*Zygomycetes*, *Deuteromycetes*) и 15 родам. Класс зигомицетов представлен 5 родами - *Mucor*, *Rhizopus*, *Mortierella*, *Tamnidium*, *Echinosporangium*. Виды указанных родов встречаются в 80 % исследованных образцов. Наиболее часто отмечаются виды – *Rhizopus nigricans* Ehrenb., *Mortierella reticulata* vTtiegh et Monier., *Mucor globosus* Fischer. Из рода *Aspergillus* выделено 11 видов, из которых 8 – являются потенциальными продуцентами микотоксинов. Это в основном виды – *A. flavus*, *A. nomius*, *A. carbonarius*, *A. nidulans*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *A. niger*, *A. fumigatus*. Из рода *Penicillium* на образцах пыльцы наиболее часто наблюдается развитие вида *P. fellutanum* из секции *Monoverticillata*. Указанный вид наиболее часто встречается на образцах пыльцы, собранного с рапса. Семейство *Dematiaceae* представлено 4 родами- *Alternaria*, *Stemphyllium*, *Cladosporium*, *Ulocladium*. Высокая частота встречаемости характерна для вида *A. alternata*. Единичными видами представлены роды *Fusarium*, *Verticillium*, *Scopulariopsis*. Методом хроматографического анализа изучена способность к биосинтезу микотоксинов у 7 штаммов *A. flavus* и 3 штаммов – *A. carbonarius*. Афлатоксин В₁ обнаружен в 4 штаммах *A. flavus* в количестве до 250 мкг/100 мл. Охратоксин А выявлен во всех трех анализируемых штаммах. В связи с тем, что обножковая пыльца находит широкое применение в апитерпии и признана как диетический продукт при лечении разных заболеваний, следует рассмотреть вопрос о лимитировании количества потенциально токсигенных мицелиальных грибов в указанном продукте.

ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВНО – ПАТОГЕННЫХ И ТОКСИНООБРАЗУЮЩИХ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ – АССОЦИАНТОВ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ

Зверева Л.В., Орлова Т.Ю., Стоник И.В., Ушева Л.Н.

Институт биологии моря имени А.В. Жирмунского ДВО РАН

Владивосток

Цель работы – микологическое обследование двустворчатых моллюсков из залива Петра Великого Японского моря: *Mizuhopecten yessoensis*, *Mytilus trossulus*, *Crenomytilus grayanus*, *Modiolus modiolus*, *Anadara broughtoni*. Указанные двустворчатые моллюски являются важнейшими объектами промысла, а приморский гребешок (*Mizuhopecten yessoensis*) и мидия тихоокеанская (*Mytilus trossulus*), кроме того, - и объектом марикультуры в Приморье.

Из внутренних органов двустворчатых моллюсков выделено в чистую культуру около 600 штаммов, идентифицировано 53 вида мицелиальных грибов, относящихся к анаморфным (Anamorphic fungi), сумчатым грибам (Ascomycota) и зигомицетам (Zygomycota). Большинство видов относится к группе условно – патогенных грибов, среди них представители родов *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *A. nidulans*, и др.), *Penicillium* (*P. citrinum*, *P. simplicissimum*, и др.), *Cladosporium* (*C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *C. oxisporum*, и др.), *Stachybotrys* (*S. chartarum*), *Alternaria* (*A. alternata*, *A. tenuissima*, и др.), *Aureobasidium* (*A. pullullans*), *Trichoderma* (*T. viride*, *T. koningii*, и др.), *Chaetomium* (*Ch. globosum*, *Ch. funicola*, и др.), *Mucor* (*M. racemosum*, *M. circinelloides*), *Rhizopus* (*Rh. nigricans*), и другие. Грибы рода *Aspergillus* чаще других микромицетов выделяются из внутренних органов обследованных двустворчатых моллюсков. Обнаруженные во внутренних органах моллюсков виды грибов из родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichoderma* известны как возбудители глубоких и оппортунистических микозов как у человека и наземных животных, так и у морских беспозвоночных и рыб.

Данные виды грибов являются продуцентами микотоксинов: афлатоксинов (*A. flavus*, *A. parasiticus*), охратоксинов (*A. ochraceus*), стеригматоцистинов (*A. versicolor*, *A. nidulans*), глиотоксинов (*A. fumigatus*) и др., и способны вызывать микотоксикозы как у человека, так и у животных из наземных и морских местообитаний. Так, грибы рода *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*) вызывают афлатоксикозы культивируемых ракообразных (Sindermann, Lightner, 1988), *A. fumigatus* продуцирует глиотоксин, накапливающийся в мягких тканях культивируемого во Франции двустворчатого моллюска *Mytilus edulis* (Grovel et al., 2003). Миколого - токсикологические исследования мускула *Mytilus edulis* показывают, что присутствие токсинообразующих грибов в моллюсках представляет реальный риск отравления людей при употреблении зараженных морепродуктов (Sallenave-Namont et al., 2000; Grovel et al., 2003).

Микобиотический мониторинг моллюсков из различных районов залива Петра Великого показал, что видовое обилие условно – патогенных и токсинообразующих мицелиальных грибов во внутренних органах моллюсков возрастает в загрязненных прибрежных водах.

Разработка метода иммуноферментного анализа содержания микотоксинов (афлатоксинов) в мягких тканях моллюсков и выделенных из них штаммах мицелиальных грибов из рода *Aspergillus* с помощью системы «RIDERSCREEN Fast (Aflatoxin)» проводится на базе Центра мониторинга вредоносных микроводорослей и биотоксичности морских акваторий ИБМ ДВО РАН.

Исследования микобиоты моллюсков проводятся при финансовой поддержке Президиума РАН и ДВО РАН («Микробная биосфера»: грант “Биоструктура комплексов мицелиальных грибов-ассоциантов гидробионтов и ее динамика под воздействием природных и антропогенных факторов”; грант № 09-III-A-06-201).

ПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ *BACILLUS SUBTILIS* ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ Т-2 И АФЛАТОКСИКОЗА ЖИВОТНЫХ

Иванов Е.Н., Тремасов М.Я., Иванов А.В., Папуниди К.Х.

ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных»

Казань

Микотоксины относятся к одной из доминирующих в последние годы групп биогенных ядов, загрязняющих как корма, так и продукты питания. При потреблении таких кормов и продуктов питания у животных и человека возникают отравления – микотоксикозы. Важным в профилактике микотоксикозов является разработка средств, снижающих уровень микотоксинов в сельскохозяйственной продукции. Перспективными в этом отношении считают биологические методы, использование микроорганизмов.

В связи с вышеизложенным поставлена цель - изучение обезвреживающего действие препарата на основе *Bacillus subtilis* – 2006 кормов, загрязненных афлатоксином В₁ и Т-2 токсином.

Предпосылкой к исследованиям профилактической эффективности препарата на основе *Bacillus subtilis* – 2006 в производственных условиях послужили результаты микологического и микотоксикологического исследования кормов, отобранных из хозяйств Кукморского района Республики Татарстан. При токсикологических исследованиях в кормах были обнаружены микотоксины (Т-2 токсин и афлатоксин В₁) в количестве 35 и 15 мкг/кг.

Были сформированы 2 группы поросят крупной белой породы 2-3 месячного возраста по 10 голов в каждой. Подбор животных в группы осуществлялся по принципу аналогов с учетом возраста и живой массы. У большинства животных наблюдались признаки субклинического отравления данными микотоксинами: отставание в росте, взъерошенность шёрстного покрова, диарея, снижение привесов.

Поросята первой группы служили контролем и получали основной рацион, вторая группа получала основной рацион, обработанный препаратом на основе *Bacillus subtilis* в разведении 1:400 в количестве 50 мл/кг корма. Критерием оценки эффективности действия культуры служило исследование клинического состояния, гематологических и биохимических показателей животных.

Изучение морфологических и биохимических показателей крови у молодняка свиней позволило проследить за физиологическим состоянием организма подопытных животных, установить влияние изучаемых факторов на динамику общего белка, белковых фракций и печеночных ферментов крови.

Установлено, что применение препарата на основе *Bacillus subtilis* оказывало положительное влияние на гематологические, биохимические и весовые показатели поросят, потреблявших обработанный корм.

Таким образом, у молодняка свиней опытных групп при использовании обработанного препаратом корма наиболее интенсивно протекали обменные процессы в организме, что положительно влияло на их гематологические и биохимические показатели крови, прирост массы тела, что свидетельствует о профилактическом действии препарата на основе *Bacillus subtilis* 2006 при микотоксикозах животных.

ГРИБЫ РОДА *PENICILLIUM* КАК ПРОДУЦЕНТЫ МИКОТОКСИНОВ

Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН

Пуццо

В ходе работ по поиску новых продуцентов биологически активных соединений среди грибов, относящихся к роду *Penicillium*, в том числе выделенных из необычных, малоизученных местообитаний, было установлено, что исследованные штаммы грибов в достаточно больших количествах могут синтезировать вещества, которые обычно относят к микотоксинам. Это в первую очередь относится к эргоалкалоидам, типичным продуцентом которых является спорынья, *Claviceps purpurea*. Большая группа штаммов способна синтезировать микотоксины дикетопиперазиновой природы. Среди них встречаются такие как рокефортин, мелеагрин, гландиколины. Было установлено, что ряд штаммов синтезирует охратоксины А и Б.

Стратегия поиска основывалась на следующих критериях: таксономическое положение штамма, позволяющее считать его креативным для синтеза вторичных метаболитов; специфическое местообитание штамма, в том числе, принадлежность к региону, из которого ранее уже были выделены продуценты и необычные, практически неизученные местообитания, уникальные по своей природе.

Так, нами была исследована токсинообразующая способность штаммов, выделенных из почв, подвергшихся антропогенным загрязнениям. Было установлено, что штаммы, относящиеся к видам *P.chrysogenum*, *P.vulpinum*, *P.spinulosum*, *P.griseofulvum*, *P.aurantiogriseum*, выделенные из городской среды и почв, загрязненных азотными удобрениями, способны продуцировать микотоксины, не встречающиеся ранее у данных видов. Штамм *P.chrysogenum*, выделенный из городской среды, с высокой продуктивностью синтезировал группу клавиновых эргоалкалоидов (фумигакалавин А, фумигакалавин Б и пироклавин). Изученный нами штамм *P.granulatum*, выделенный из дерново-подзолистой почвы, продуцировал микотоксины группы рокефортин (мелеагрин, рокефортин, дигидророкефортин). Гриб *P.vulpinum* (*P.claviforme*), выделенный из городской среды, показал высокую продукцию циклопиазоновой кислоты и ее имина. Новые продуценты микотоксинов, относящихся к эргоалкалоидам и дикетопиперазинам были обнаружены среди трех видов грибов серии грибов *Canescentia* (*P.canescens*, *P.waksmanii*, *P.janzcewskii*) и трех видов грибов серии *Fellutana* (*P.fellutanum*, *P.waksmanii*, *P.jensenii*), относящихся к секции *Divaricatum* подрода *Furcatum* рода *Penicillium*.

Исследован спектр микотоксинов у 4 штаммов вида *P.chrysogenum* и 6 штаммов вида *P.expansum*, выделенных в орбитальной станции “Мир”. Показано, что все они синтезируют микотоксины, как известные для грибов этих видов - рокефортин, 3,12-дигидророкефортин, мелеагрин, виридикатин, виридикатол, так и новые - изоругулозувин, ругулозувин Б.

Скрининг грибов рода *Penicillium*, выделенных из многолетнемерзлых древних отложений Арктики и Антарктики показал, что грибы-реликты являются продуцентами микотоксинов. Синтезируемые метаболиты относятся к разным структурным типам: клавиновым, дикетопиперазиновым и хинолиновым соединениям. Установлено, что три штамма вида *P. aurantiogriseum*, способны синтезировать дикетопиперазиновые микотоксины рокефортин и 3,12-дигидророкефортин. Кроме того, обнаружено, что пять штаммов-реликтов *P. variable* синтезируют идентичный набор клавиновых микотоксинов - ругуловазинов А и Б. Продукция данных микотоксинов впервые обнаружена для грибов этого вида. Биосинтез эргоалкалоидов эпоксиагроклавина-1 и агроклавина-1, а также микотоксинов хинолиновой природы – хиноцитрининов, характерен для гриба-реликта *P.citrinum*.

ОПЫТ РАЗРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОРЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА 12,13-ЭПОКСИТРИХОТЕЦ-9-ЕН-8-ОНОВ

Кононенко Г.П., Буркин А.А.

ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН

Москва

Для обеспечения безопасности зерна, пораженного фузариозом, ключевое значение имеет организация эффективного контроля его загрязненности 4-дезоксиниваленолом (ДОН). По мировым оценкам этот фузариотоксин не имеет себе равных по распространенности в ареалах интенсивного возделывания колосовых культур (Aldred, Magan, 2004). В контаминации зерна участвуют два его структурных аналога – моноацетаты 3-АДОН и 15-АДОН (Visconti et al., 1986; Леонов и др., 1988; Cavaliere et al., 2005), а также ниваленол (НИВ) (Sundheim et al., 1988; Tanaka et al., 1990; Rafai et al., 2000). В этой связи предпринимаются активные попытки разработки иммуноферментного анализа для индивидуального или суммарного определения этих токсинов, главным образом, на основе гибридной технологии. Японскими исследователями были получены клоны антител с высокой аффинностью к триацетату НИВ и к сумме ди- и триацетатов ДОН (Kohnno et al., 2003; Yoshizawa et al., 2004) и только недавно удалось получить моноклональные антитела с близким узнаванием ДОН и НИВ (Maragos et al., 2006).

Нами впервые разработан иммуноферментный анализ с близкой специфичностью в отношении ДОН, 3-АДОН, 15-АДОН и НИВ, основанный на применении поликлональных кроличьих антител. Для получения иммунореагенов были использованы 3-гемисукцинат ДОН (3-гсДОН) и 15-гемисукцинат ДОН (15-гсДОН), выделенные из предварительно очищенного продукта сукцинилирования ДОН методом обращеннофазовой ВЭЖХ (градиент 18% ацетонитрила в воде и 1% водного раствора муравьиной кислоты). Иммунизация животных конъюгатом 3-гсДОН с бычьим сывороточным альбумином после трех введений иммуногена привела к получению антител, которые в сочетании с иммобилизованным желатин-15-гсДОН обеспечивали конкурентный анализ ДОН с 50%-ным уровнем ингибирования связывания антител (ИК₅₀), равным 5,1 нг/мл. Значения равноингибирующих концентраций для его природных аналогов составили 25,1 нг/мл (3-АДОН), 44,7 нг/мл (15-АДОН) и 32,0 нг/мл (НИВ). Чувствительность метода при оценке контаминации зерна, продуктов его переработки, кормов составляла 20 мкг/кг в эквивалентах ДОН.

За период 2007-2008 гг. нами было обследовано 66 образцов фуражного зерна (пшеница, ячмень, кукуруза) и 46 образцов других видов кормового сырья (горох, соя, продукты переработки сои, семян подсолнечника и кукурузного зерна). Положительные результаты были получены для всех видов зерна – пшеницы (3/35, 60, 168, 950 мкг/кг), ячменя (6/19, 24-160 мкг/кг), кукурузы (4/12, 40-2810 мкг/кг), для кормов из сои (9/21, 20-1580 мкг/кг) и «глютена кукурузного» (4/5, 141-315 мкг/кг). Для гороха (0/5), жмыхов и шротов из подсолнечника (0/15) результаты оказались отрицательными. Частота контаминации полнорационных комбикормов для животных в те же годы составила 33,3%. Из 282 исследованных образцов положительными были 94, при этом 67 из них имели уровни контаминации менее 100 мкг/кг (20-94 мкг/кг). Содержания от 100 до 1000 мкг/кг определены у 22-х образцов и лишь для 5-ти была продемонстрирована сверхнормативная загрязненность от 1780 до 3630 мкг/кг.

МОНИТОРИНГ ЯДОВИТЫХ ГРИБОВ ЗАПАДНОЙ ЧАСТИ ЦЕНТРАЛЬНОГО КАВКАЗА.

Крапивина Е.А., Шагапсоев С.Х.

Кабардино-Балкарский государственный университет

Нальчик

Агарикоидные грибы являются ценным пищевым продуктом. В последнее время у населения возрос интерес к грибам. В связи с этим вероятность грибных отравлений резко возрастает и возникает необходимость мониторинга биоразнообразия ядовитых и съедобных дикорастущих грибов. На основе собственных сборов и опроса грибников-любителей, выявлено 37 видов из 17 родов и 11 семейств ядовитых грибов. Наряду с ними можно выделить группу условно съедобных грибов из 8 видов, 2 родов и 1 семейства: *Lactarius pubescens*, *L. torminasus*, *L. flexuosus*, *L. necator*, *L. rufus*, *L. vietus*, *L. hexuosus*, *Russula cyanoxantha*.

Эколого-трофический анализ показал, что наиболее представлены микоризообразователи (симбиотрофы) 35,18%, также большим объемом характеризуется наличие сапротрофов опада и подстилки 27,07%, ксилотрофы составляют 21,62%, а видовой состав гумусовых сапрофитов 16,2%.

Среди ядовитых грибов произрастающих в регионе наиболее опасна бледная поганка, токсины которой оказывают необратимое воздействие на печень и кроветворные органы человека. Особенно ее легко можно спутать со съедобными сыроежками и шампиньонами. Ядовитые грибы отличаются по характеру воздействия на организм человека можно разделить на 3 группы, что связано с их химическим составом.

К первой группе относятся смертельно ядовитые грибы которые содержат – фаллоидин, фаллоин, фалоцин, фаллизин, и др. (*Amanita phalloides*, *A. Virosa* и др.). Как показывают исследования, аманитины – это сложные химические соединения белковой природы. Токсическое действие аманитотоксинов происходит за счет ингибирования РНК- полимеразы типа II, фермента, участвующего в синтезе предшественника информационной РНК, ответственной за синтез внутриклеточного белка. В первую очередь страдают гепатоциты и энтероциты, что и лежит в основе всех проявлений интоксикации. Во вторую группу включают грибы, воздействующие на ЦНС. В состав этих грибов входят такие ядовитые соединения – мускарин, мускаринидин – с нейротропным действием (*Amanita muscaria*, *A. Pantherina*, *Clitocybe dealbata*, *Mycena rosea*). Проявляется развитием психических расстройств (депрессией, атаксией, оглушенностью) и галлюцинаций зрительных, слуховых и зрительно-слуховых, истероидным поведением, гиперкинезами. К третьей группе относят грибы, употребление которых приводит к легким пищевым отравлениям, сопровождающимся нарушениями функций пищеварения (*Huipholoma fasciculare*, *H. Laterium*). Рядом ученых к этой группе причислены «условно съедобные» грибы, в нашем случае это грибы рода *Gyromitra*, *Helvella*, *Coprinus*, для которых требуется предварительная обработка. И хочется отметить, что они могут стать ядовитыми при одновременном употреблении алкоголя. В литературе имеются сведения, что «коприновый» синдром развивается при употреблении *Clitocybe clavipes* и *Boletus luridus*.

Острые отравления ядовитыми грибами возникают вследствие малой осведомленности населения об особенностях строения и внешних признаков ядовитых грибов. Решение проблемы отравления грибами включает комплекс организационных мероприятий, в проведении которых необходимо участие государственных учреждений по распространению специальной литературы, методических рекомендаций, буклетов, информационных плакатов и др. Комплекс представленных мероприятий будет способствовать уменьшению количества отравлений грибами и повышению эффективности лечения этой тяжелой категории больных.

Работа выполняется при поддержке гранта РФФИ № 09-04-96508

НОВЕЙШИЕ ДАННЫЕ ПО РЕГУЛЯЦИИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО СТАТУСА КЛЕТОК МИКОТОКСИНОМ ФУМОНИЗИНОМ В1

Мартынова Е.А.

ГУ НИИ питания РАМН

Москва

Микотоксин фузонизин В1 (FB1) продуцируется микроскопическими плесневыми грибами рода *Fusarium moniliforme, proliferatum* и другими родственными видами. В настоящее время определены многочисленные мишени действия фузонизина В1 в клетках и тканях млекопитающих. В данной работе мы впервые описываем новые эффекты фузонизина В1, связанные с энергетическим потенциалом организма животных. В последние годы активно изучается регулятор энергетического статуса клеток – нутриентзависимая, энергочувствительная киназа TOR, которая в клетках млекопитающих называется mTOR (mammalian Target of Rapamycin) и формирует, как минимум, два мультибелковых комплекса в цитоплазме, а также комплекс на внешней мембране митохондрий. Связь между киназой mTOR и уровнем АТФ в клетке осуществляется с помощью циклоАМФ - активированной протеинкиназы АМПК, которая фосфорилирует один их компонентов комплекса mTOR. Далее сигнал передается на ряд вторичных мессенджеров, регулирующих трансляцию белков и деление клеток. Сигнальные пути киназы mTOR пересекаются с сигналами рецепторов инсулина и регуляцией метаболизма глюкозы в клетках.

Целью работы было изучение влияния фузонизина В1 на экспрессию АТФ-зависимой протеазы Lon, киназы mTOR, β -рецептора инсулина ($IR\beta$), транспортеров глюкозы Glut1 и Glut4, а также определение взаимосвязи этих показателей с уровнем клеточного дыхания, пролиферацией клеток и с апоптозом. Работа проведена на мышах линии C57Bl6, которым фузонизин В1 вводился i.p. однократно или многократно в дозах, для которых ранее была показана эффективность в отношении клеток иммунной системы. Были получены первичные культуры клеток тимуса, селезенки и печени мышей. Экспрессию Lon, mTOR, $IR\beta$, Glut1 и Glut4 определяли с помощью моноклональных антител, уровень ДНК в клетках определяли по окраске пропидиумом иодидом на проточном цитометре FACSCalibur (Beckton Dickinson, USA) по программе Cell Quest.

Результаты. Было установлено, что фузонизин В1 оказывает дозозависимое влияние на экспрессию киназы mTOR, β -рецептора инсулина и транспортеров глюкозы Glut1 и Glut4. Действие фузонизина В1 органоспецифично и зависит от состояния клетки и фазы клеточного цикла. В тимусе, где основная масса клеток делится и подвергается селекции, введение фузонизина В1 в дозе 0,05 – 1 мкг на 1 г веса животного вызывает снижение процента клеток, экспрессирующих киназу mTOR, а также снижение интенсивности флюоресценции. Это сопряжено со снижением уровня ДНК в популяции клеток, ингибированием пролиферации тимоцитов и остановкой клеточного цикла в G2 фазе у определенной части тимоцитов. Одновременно снижается экспрессия рецепторов инсулина и транспортеров глюкозы на мембране клеток. При повторном введении фузонизина В1 в дозах \square 0,5 мкг на 1 г веса животного регистрируется падение уровня АТФ в клетке, резкое снижение экспрессии киназы mTOR и активация стрессовых белков, сопряженных с эндоплазматическим ретикуломом. В клетках селезенки, которые являются более дифференцированными по сравнению с тимоцитами, фузонизин В1 оказывает несколько менее выраженное действие на киназу mTOR и регуляторы транспорта глюкозы, однако, влияние фузонизина В1 на клетки тимуса и селезенки имеет, в целом, сходные черты. В клетках печени, деление и обновление которых происходит в несколько раз медленнее лимфоцитов, и которые содержат на порядок больше митохондрий, чем лимфоциты, фузонизин В1 оказывает более выраженное ингибирующее влияние на киназу mTOR. Снижение уровня mTOR в гепатоцитах коррелирует с угнетением клеточного дыхания, а также с активацией АТФ-зависимой Lon протеазы, индукцией митохондриального типа апоптоза, снижением уровня ДНК и ингибированием пролиферации гепатоцитов.

Выводы. Фузонизин В1 в дозах 0,05 – 1 мкг на 1 г веса мышей снижает процент клеток, экспрессирующих энергозависимую киназу mTOR, а также интенсивность флюоресценции клеток, что сопровождается падением уровня АТФ в клетках, активацией протеолиза, снижением уровня ДНК в клетках, остановкой клеточного цикла в популяции интенсивно делящихся клеток, и

активацией апоптоза. В более высоких дозах эффект фумонизина В1 проявляется в резком падении энергетического потенциала клеток, что приводит к быстрому развитию апоптоза и некроза в клетках печени, селезенки и тимуса животных.

ПРОБЛЕМА САНИТАРНО-МИКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПРОДОВОЛЬСТВЕННОГО ЗЕРНА: НОВЫЕ РИСКИ

Минаева Л.П., Шевелева С.А.

ГУ НИИ питания РАМН

Москва

В настоящее время требуется повышенное внимание к исследованию зараженности продовольственного зерна токсигенными грибами, в частности рода *Fusarium*. Поражение зерна обусловлено рядом причин: условия произрастания зерна (неблагоприятные метеоусловия – обильные дожди, ранний снег и др.), условия при уборке урожая (метеоусловия – дожди в период уборки, вывоз поздней осенью с полей), условия при хранении (недостаточно просушенное зерно или повышенная влажность в зернохранилище), используемые агротехнические приемы (применение пестицидов), а также качество посевного материала (устойчивость к поражению фузариозом). В зависимости от причин зерно поражается «полевыми грибами» (*Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria* и др.) или «грибами хранения» (*Aspergillus*, *Penicillium*, мукоровые грибы).

Мука, полученная из зерна, содержащего мицелий гриба не пригодна для питания. В зависимости от степени поражения зерно бракуют или подсортировывают к партиям здорового зерна. Продукты жизнедеятельности грибов не теряют своих токсических свойств при термической обработке.

Наибольшую опасность для человека представляют микотоксины, которые отличаются высокой токсичностью и могут проявлять мутагенное, терратогенное и канцерогенное действие. Так нормируемые показатели для различных пищевых продуктов составляют сотые доли микрограмм: афлатоксин В – 0,00015-0,005 мг/кг; афлатоксин М – 0,00002-0,0005 мг/кг; ДОН - 0,7-1,0 мг/кг; зеараленон – 0,005-1,0 мг/кг; патулин - 0,02-0,05 мг/кг; Т-2 токсин - 0,05-1,0 мг/кг.

В настоящее время повысилась доля мелких хозяйств в заготовке продовольственного зерна, большинство из которых не в состоянии обеспечить высокоэффективные технологии в уборке, хранении зерна и контроле качества зерна, что может приводить к увеличению риска загрязнения зерна токсинообразующими грибами.

В тоже время все чаще отмечается расширение спектра токсинообразования, и токсины свойственные определенному виду грибов обнаруживаются у «несвойственных» грибов.

Учитывая вышесказанное, становится необходимым для составления целостной картины и определения мер безопасности, проведение комплексных исследований – мониторинга - по оценке зараженности продовольственного зерна токсинообразующими грибами. Это исследование видового состава грибов на разных этапах производства и хранения зерна, ареалов наибольшего поражения, оценке уровней содержания токсинов в зерне и в продуктах его переработки, определение фактора патогенности.

Работа ведется в ГУ НИИ питания РАМН междуведомственным коллективом с участием специалистом РАСХН.

ОТРАВЛЕНИЕ ЯДОВИТЫМИ ГРИБАМИ

Мусселиус С.Г.

МЦ УД Мэра и Правительства, клиническая больница № 3

Москва

Отравления ядовитыми грибами носят не только сезонный характер, но и во многом определяются социально-экономическими условиями в стране. В 90-ые годы, в период ухудшения благосостояния населения, возрос спрос на природные продукты, в частности, на дикорастущие грибы. За период 1993-95 гг. на территории России число пострадавших по официальным данным составило 2687 человек. В последние годы достигнуты большие успехи в лечении больных с отравлением грибами. В отделениях токсикологической и общей реанимации лечение больных проводят соответственно протоколу, составленному научно-информационным центром Росздрава. За период 2006-08 гг. в Москве и в московской области были единичные случаи отравления ядовитыми грибами без смертельных исходов. Объяснением уменьшения количества больных с отравлениями грибами может служить не только высокий уровень лечения пострадавших в отделениях токсикологической и общей реанимации, но и активная просветительная работа средств массовой информации с населением (телевидение, радио, печать). Безусловно, большую роль в этом сыграла широкая продажа по доступной цене культивируемых грибов (шампиньонов, вешенки обыкновенной и др.). Наибольшую опасность для жизни представляют отравления бледной поганкой. Но и не менее грозным являются отравления мухоморами красным, пантерным и желтым. При приеме этих грибов развивается микоатропиновый синдром. Основными токсикантами, входящими в состав грибов, являются иботеновая кислота и мусцимол. Содержание мускарина чрезвычайно мало и не определяет клиническую картину. Отравления возникают, как правило, при употреблении грибов с целью получения наркотического эффекта. Токсиканты, воздействуя на нейросенсорные отделы коры головного мозга и периферические нервные окончания, приводят к развитию отравления, протекающему по типу холинолитического синдрома. В наших наблюдениях у трех больных при осмотре отмечалась тахикардия, мидриаз, сухость слизистых. Период визуальных галлюцинаций был коротким и составлял - 5-10 минут. У одного больного через 20 минут после употребления грибов развилось коматозное состояние. Развитие желудочно-кишечных расстройств проявлялось тошнотой. При тяжелом отравлении мухомором красным у больного развилась сердечно-легочная недостаточность, что потребовало проведение искусственной вентиляции легких. Максимальная продолжительность коматозного периода составила у одного больного 17 часов. Как показывает наш клинический опыт введение больным седативных препаратов (реланиум, седуксен) и форсированного диуреза оказывают выраженный лечебный эффект. Следует отметить, что в условиях экономического спада в 2009 году можно ожидать увеличение количества пострадавших с отравлением ядовитыми грибами. Возможно, также увеличится количество обращений в стационар и пациентов после употребления в пищу съедобных грибов. Это касается лиц, страдающих заболеваниями желудочно-кишечного тракта, ферментопатией, иммунной недостаточностью. Правильный диагноз определяет своевременное, то есть как можно раннее, оказание лечебной помощи больным с жизнеугрожающим отравлением ядовитыми грибами.

ПОИСК, ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИНОПРОДУЦИРУЮЩИХ ИЗОЛЯТОВ ГРИБА РОДА FUSARIUM

Рыстаева Р.А., Орынбаев М.Б., Мамадалиев С.М.

*Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности
п. Гвардейский, Жамбылская область, Казахстан*

Микроскопические грибы рода *Fusarium* часто поражают зерно хлебных злаков, пищевые продукты, корма и другие виды растительного сырья. В процессе жизнедеятельности они образуют низкомолекулярные токсические продукты - микотоксины. Действуя как на вегетативные, так и на репродуктивные органы растений, микотоксины вызывают их увядание, повреждение и гибель, у зерновых - повреждение колоса, а впоследствии и зерна. Одними из наиболее опасных микотоксинов, продуцируемых грибами *Fusarium sporotrichiella*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium solani* являются трихотеценовые микотоксины – дезоксиниваленол, Т-2 токсин и зеараленон. Как у человека, так и у сельскохозяйственных животных эти микотоксикозы сопровождаются рвотой, отказом от пищи, некрозами в ротовой полости и дерматитами.

Целью настоящей работы было выявление продуцентов микотоксинов - дезоксиниваленол, зеараленон и Т-2 токсин среди изолятов гриба рода *Fusarium*.

В ходе экспериментов были выделены 13 изолятов гриба рода *Fusarium*, из пораженных фузариями зерен пшеницы и кукурузы на среде Чапека. Проведены исследования по изучению их морфолого – культуральных признаков и способности продуцировать микотоксины: дезоксиниваленол, зеараленон и Т-2 токсин. Культивирование гриба проводили на зернах пшеницы при разных температурных режимах, экстрагировали микотоксины различными органическими растворителями, разделение токсинов осуществляли с помощью метода тонкослойной хроматографии в системах растворителей гексан – изопропанол – вода 73,5:25:1,5, хлороформ – этанол 97:3 и этилацетат – толуол 3:1.

В результате проведенных исследований установлено, что по морфолого – культуральным признакам выделенные изоляты отнесены к грибу роду *Fusarium*. Обнаружено 8 изолятов гриба, продуцирующих микотоксины ДОН, ЗЛ и Т-2 токсин, из них 7 - продуцируют микотоксин ДОН, 3 - продуцируют Т-2 токсин и 4 изолята продуцируют зеараленон, которые пригодны для наработки данных микотоксинов из субстратов.

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ СПЕЦИФИЧНЫХ К МИКОТОКСИНУ ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛ Рыстаева Р.А., Орынбаев М.Б., Мамадалиев С.М.

*Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности
п. Гвардейский, Жамбылская область, Казахстан*

Среди многочисленных факторов окружающей среды токсические вещества - микотоксины, образуемые микроскопическими грибами, в последнее время привлекают все большее внимание. Микотоксины поражают зерно, как в поле, так и во время хранения и переработки. Зерно и зерновые продукты, загрязненные микотоксинами, представляют серьёзную опасность для производителей зерновой и животноводческой продукции. По данным последних исследований 25% всех зерновых в мире в той или иной степени поражены микотоксинами. Микотоксины не только понижают ценность собранного урожая, но и вызывают заболевания у сельскохозяйственных животных, приводящие к снижению продуктивных показателей.

Существующие химические методы, как выделения, так и определения микотоксинов исключительно сложны и трудоемки. Биологические методы не всегда достаточно специфичны или же требуют большого числа лабораторных животных.

В этой связи представляется перспективной разработка методов иммунохимического определения микотоксинов, в основе которого лежит взаимодействие антигенов с антителами.

Целью нашей работы являлось получение иммунореагентов на основе микотоксина дезоксиниваленол, пригодных для постановки иммуноферментного анализа.

В экспериментах использовали трихотеценовый микотоксин-дезоксиниваленол (ДОН), полученный в НИИПББ, гемигидрохлорид аминокислоты (карбоксиметоксиламин), N-гидроксисукцинимид, гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (Sigma, США), пероксидазу хрена (Израиль), козы антикроличьи антитела (Serva), БСА (Serva), желатин (Serva).

Проведенные эксперименты позволили получить методом карбодиимидной конденсации конъюгат гаптена микотоксина дезоксиноваленол с бычьим сывороточным альбумином (БСА) и методом формальдегидной конденсации конъюгат гаптена ДОН с желатином с 10, 25, 50 – кратными мольными избытками гаптена.

Для получения специфичных к микотоксину ДОН сывороток нами была проведена пятикратная иммунизация кроликов с интервалом в 30 дней, не содержащих в крови антител к данному микотоксину. Через 7 суток после каждой инъекции у животных из вены брали кровь и определяли титр антител в ИФА. При наличии в сыворотке антител в титре 1:50000 и выше животных обескровливали со сбором крови для выделения сыворотки. Контроль активности специфических к микотоксину ДОН сывороток проводили методом непрямого иммуноферментного анализа. В качестве твердофазного антигена использовали конъюгаты БСА-ДОН и Желатин- ДОН, полученные карбодиимидной и формальдегидной конденсацией с 10, 25, 50 – кратными мольными избытками гаптена.

Результаты проведенных экспериментов показали, что методы карбодиимидной и формальдегидной конденсации позволяют получать конъюгаты БСА-ДОН и Желатин-ДОН, пригодные для иммунизации животных и использования в качестве твердофазного антигена при постановке иммуноферментного анализа.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИММУНОСТИМУЛЯТОРОВ НА ТЕЧЕНИЕ СМЕШАННОГО Т-2-АФЛАТОКСИКОЗА ЖИВОТНЫХ

Семёнов Э.И., Тремасов М.Я., Валиев А.Р.

*Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных
Казань*

Для профилактики микотоксиозов. интерес вызывает использование сорбентов и веществ, повышающих общую резистентность организма. Часто микотоксиозы протекают сочетано с бактериальными и вирусными инфекциями. Некоторые авторы рассматривают иммуносупрессию в результате длительного воздействия микотоксинов как одну из форм микотоксиноза имеющую возможно более практическое значение, чем острые формы. Одним из способов поддержания нормального функционирования иммунной системы и восстановления иммунитета при иммунодефицитных состояниях является применение иммуномодуляторов.

Настоящая работа касается изыскания и изучения возможности применения различных иммуностимуляторов при смешанном Т-2-афлатоксикоze животных и для усиления профилактического действия сорбентов т.к. результаты ранее проведённых исследований на лабораторных и сельскохозяйственных животных показали эффективность энтеросорбентов, однако, даже при выраженном профилактическом эффекте сорбентов у животных происходило снижение показателей неспецифической резистентности животных.

Опыты проведены на 48 белых крысах в течение 15 суток. Животным первой группы вводили Т-2 токсин и афлатоксин В₁ в виде 5% спиртового раствора внутривентрикулярно, в дозах 1/10 ЛД₅₀.

Крысам второй группы вводили микотоксины в аналогичной дозе и внутрь иммуностимулятор левамизол в дозе 4 мг/кг массы тела в течение 3 дней, после 4-х дневного перерыва, вновь выпаивали препарат в течение 3 дней. Животным третьей группы - микотоксины и дибазол внутрь в дозе 6 мг/кг массы тела ежедневно. Четвертой группе крыс вводили внутривентрикулярно микотоксины и димефосфон в дозе 90 мг/кг массы ежедневно.

В качестве параметров контроля течения токсикоза служили клинические признаки, гематологические показатели, содержание МДА и показатели неспецифической резистентности крыс. Исследуемые показатели сравнивали с фоновыми.

Изменение гематологических показателей регистрировалось во всех группах. Так, в первой группе количество эритроцитов на 15 сутки уменьшалось на 21,3%; количество лейкоцитов - на 23,9%; содержание гемоглобина на 13,7%. Во второй группе снижение эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина составило 20,2; 22,5 и 12,4% соответственно. В третьей группе 19,4; 20,5 и 11,5% соответственно. В четвёртой группе - на 16,9; 15,8 и 8,7% соответственно. Наибольшее увеличение МДА было в первой группе на 27,0%, во второй группе - 23,0%; в третьей - 25,2%; и наименьшее увеличение в четвёртой группе на 16,4%. Лизоцимная активность у животных в первой группе снижалась к 15 сут на 9,4%; во второй группе на 8,1%; в третьей - и 8,1%; в четвёртой - на 7,9%. Фагоцитарная активность снизилась в первой группе на 12%, во второй - на 6,9% (p<0,05), в третьей - на 4,4%, в четвёртой - на 1,6% (p>0,05). Фагоцитарное число в первой группе уменьшалось на 13,1%, во второй группе на 5,3%, в третьей - на 3,05%, в четвёртой - увеличивалось на 1,6%. Фагоцитарная ёмкость в первой группе закономерно снижалась 32,6%; во второй группе 25,4%. в третьей - на 22,6%, в четвёртой - 14,9%.

Таким образом, результаты проведенных исследований, а также наблюдения за подопытными животными, свидетельствуют о том, что наиболее выраженным защитным эффектом при подострой интоксикации Т-2 токсином и афлатоксином В₁ обладает димефосфон. Оценивая полученные результаты, также можно заключить, что проведенные исследования имеют перспективу продолжения их с целью усовершенствования средств защиты животных при микотоксинозах животных.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ДЕЙСТВИЯ T-2 ТОКСИНА И ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛА НА КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В СИСТЕМЕ IN VITRO

Сивогринов Д.Е., Коломбет Л.В.

НИИ токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов ФМБА

Серпухов

На моделях *in vitro* определили 50% ингибиторную концентрацию (IC50) при действии T-2 токсина, дезоксиниваленола (ДОН) и фунгицида тебуконазола. Цитотоксичность испытывали на двух культурах клеток млекопитающих – первичных эмбриональных фибробластах крысы и постоянной линии человеческого происхождения (клетки карциномы легкого человека – А 549) с использованием классического метода по включению жизнеспособными клетками красителя нейтральный красный и с помощью прибора Cell-IQ .

В отличие от традиционных методов определения цитотоксичности, которые в большинстве своем оценивают состояние клеточной популяции в конечной точке эксперимента, автоматизированная система Cell-IQ (Chip-Man Technologies Ltd, Finland) позволяет наблюдать за конкретной клеткой от начала до конца эксперимента.

Прибор Cell-IQ открывает новые возможности изучения культур клеток (животных, растительных), поскольку в режиме реального времени позволяет анализировать базовые характеристики клеточной популяции *in vitro* (общее число клеток, число делящихся клеток, число погибших клеток, индекс частоты митозов). Оптическая система в комплексе с программным обеспечением позволяет оценить также динамические (направление движения, скорость) и морфологические (изменения в цитоплазме и ядре) характеристики клеток в течение всего времени воздействия. Изображения состояния клеток в ходе эксперимента в виде файлов сохраняются и могут быть повторно проанализированы для получения дополнительной информации.

50% ингибиторная концентрация T-2 токсина (IC50) для первичных фибробластов крысы составила 10 нг/мл и для клеток карциномы легкого человека - около 4 нг/мл.

50% ингибиторная концентрация ДОН при введении в культуру крысиных эмбриональных фибробластов составила 0.5 мкг/мл.

IC50 при введении тебуконазола в культуру крысиных эмбриональных фибробластов составила 35 мкг/мл. Клетки карциномы легкого человека А 549 оказались менее чувствительны к тебуконазолу, чем первичные фибробласты крысы и концентрация в 50 мкг/мл, снижающая жизнеспособность фибробластов почти на 100%, подавляла культуру клеток карциномы легкого человека А 549 всего на 40%.

С помощью прибора Cell-IQ провели мониторинг изменений в клеточной популяции крысиных эмбриональных фибробластов под действием T-2 токсина, ДОН и фунгицида тебуконазола. Показали, что данные, полученные с помощью нового прибора Cell-IQ, согласуются с данными классического метода по включению красителя, в то же время более детально оценивают характер проявления токсичности. Так, при оценке цитотоксичности по включению красителя можно говорить лишь о снижении измеряемого параметра относительно контроля, однако по какой причине происходит это снижение, остается неясным. С помощью системы Cell-IQ появляется возможность оценивать характер цитотоксичности. Например, при действии ДОН в концентрации 1 мкг/мл на культуру крысиных эмбриональных фибробластов уровень цитотоксичности, оцененный обоими способами, составил 60%. С помощью Cell-IQ было показано, что только 5% из 60% обусловлено гибелью клеток, а 55% является следствием прекращения пролиферации клеток. Кроме того, прибор позволяет исследовать процесс восстановления функций жизнеобеспечения (*recovery test*) после удаления токсиканта, что было показано в наших экспериментах с изучением цитотоксичности ДОН.

Таким образом, прибор Cell-IQ может быть использован для изучения механизма действия различных веществ на клеточном уровне.

БИОЛОГИЧЕСКИЙ СМЫСЛ ОБРАЗОВАНИЯ МИКОТОКСИНОВ ДЛЯ ИХ ПРОДУЦЕНТОВ

Скоробогатова Р.А., Жебрак И.С.

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы

Гродно

Среди продуктов вторичного метаболизма микроскопических грибов значительное место принадлежит микотоксинам. По поводу их биологической роли имеются различные точки зрения. Одна из них: «образование огромного числа вторичных соединений, по-видимому, не имеет большого значения для синтезирующих их организмов. Способность к их синтезу может быть утрачена, при этом исчезновение их не приносит большого ущерба для продуцента» (Лукнер М., 1979). Далее тот же автор высказывает мнение о том, что некоторые вторичные метаболиты всё же необходимы продуценту для образования соединений, имеющих экологическое значение, так как эти вещества могут принимать участие в установлении экологических взаимосвязей между микроорганизмами, животными и растениями.

Взаимоотношение и взаимодействие сапрофитных грибов и растений изучены недостаточно. Однако подобное исследование всех тонкостей и особенностей этих взаимодействий имеет фундаментальную важность, сулящую новые научные открытия и большой практический эффект. Примером такого исследования является изучение биологической роли микотоксина цитринина. По нашим данным токсин *Penicillium citrinum* Thom – цитринин образуется в почве при инокуляции её спорами продуцента, но недолго сохраняется в ней. Его действие исчезает на 12-е сутки. Токсин поступает в растение, распределяется в надземных и подземных органах, тормозит первоначальный рост, в некоторых случаях вызывает морфологические изменения корневой системы. Реакция растения на присутствие цитринина проявляется в активации дыхания, снижения активности терминальных оксидаз в течение непродолжительного времени. В то же время цитринин не оказывает существенного влияния на синтез хлорофилла и содержания общего азота в растениях. Таким образом, цитринин обладает слабым системным действием на физиолого-биохимические процессы растений. Нормализация обмена веществ у растений происходит в фазе цветения на 50-е сутки роста.

Одновременно исследованиями ряда авторов было выявлено различное действие цитринина на живые организмы: антибактериальное на грамположительные бактерии, инсектицидное на личинки комара *Aedes egyptii*, гербицидное (Мирчинк и соавторы, 1966), фунгицидное к 16 видам фитопатогенных грибов (Verona a. Gambogi, 1952; Moira E.K. Henderson, 1956; Robinson, 1966; Betina, Ruckova, 1972). Противовирусное действие цитринина было открыто в Японии в 1972 году (Yasuda, Yasushi a. oth.). Авторы обнаружили, что цитринин угнетает размножение вируса табачной мозаики в растениях *Nicotiana glutinosa* в зависимости от времени и интенсивности обработки.

На основании приведенных исследований можно сделать заключение о том, что цитринин действует подобно природным ингибиторам роста, выделенных из растений фенолкарбоновых кислот таких, как салициловая, коричная, кумаровая, ферулиевая и их производные (Кефели и Турецкая, 1964). Цитринин будучи природным ингибитором роста может играть роль в повышении иммунитета растений. С этой целью он может использоваться на практике для иммунопротекторного воздействия на растения.

Таким образом, цитринин один из продуктов вторичного метаболизма микроскопических грибов из родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Monascus*, а также бобового растения *Crotalaria crispata* благодаря своему множественному воздействию на различные организмы принимает участие в межорганизменном обмене веществ сообщества, выполняя функцию сигнального метаболита во взаимоотношениях разных организмов. На основании сказанного можно сделать вывод о биологической роли цитринина: он необходим продуцирующим его организмам для самоутверждения в определенной экологической нише сообщества микроорганизмов, животных и растений.

МИКОТОКСИКОЗЫ И ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ СВИНЕЙ ИНФЕКЦИОННЫМИ БОЛЕЗНЯМИ

Солдатенко Н.А

*Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт
Новочеркасск*

Проводимый нами с 2003 г., мониторинг микотоксинов в кормах показал, что микотоксины распространены широко. Не обнаружено ни одного типа корма, где бы их не находили. Возникшие вопросы по качеству кормов, для исследователей в области инфекционной патологии ставят такие проблемы, как неэффективность методов лечения, низкая эффективность иммунных обработок, сложности в дифференциальной диагностике заболеваний.

Цель данной работы – определить роль микотоксинов в возникновении острых и хронических заболеваний в свиноводческих хозяйствах. Роль микотоксикозов при массовых заболеваниях свиней изучали в 6 хозяйствах Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краев на поголовье 18 тысяч свиней.

В этих хозяйствах проведено клиническое обследование свиней, патологоанатомическое вскрытие, а так же бактериологические исследования патматериала от павших и вынужденно убитых животных, которые с кормом длительное время получали микотоксины в количествах значительно превышающих МДУ (минимально допустимый уровень)

Микологическими исследованиями 7 типов кормов получена информация о видовом составе микромицетов – продуцентов токсинов.

Преимущество в контаминации кормов (как цельного зерна, так и готовых кормов) принадлежит видам трех родов микромицетов: *Aspergillus*, *Fusarium* и *Penicillium*.

В трёх хозяйствах Ставропольского края и Ростовской области в кормах установлено наличие Т-2 токсина и охратоксина в концентрациях трехкратно превышающих МДУ. У заболевших свиней на различных участках кожного покрова вначале отмечали гиперемии, затем точечные и обширные кровоизлияния с последующим некрозом пораженных участков, причем наиболее часто поражалась кожа ушных раковин, корня хвоста, промежности и ног, а в дальнейшем все участки тела. Животные были угнетены, корм поедали плохо или полностью отказывались от него. При обширных поражениях кожи свиноматки погибали.

При патологоанатомическом вскрытии установлено: катарально-геморрагический и некротический гастроэнтероколит, дистрофические изменения в печени и почках, кровоизлияния в подкожной клетчатке.

При одновременном загрязнении кормов зеараленоном, охратоксином и афлотоксином у свиней установлено нарушение функции воспроизводства среди маточного поголовья: низкий процент оплодотворяемости, прохолосты более 50%, недоразвитие матки и яичников у ремонтных свинок, а также массовые поражения почек, печени и желудочно-кишечного тракта. Среди молодняка 4-6 месяцев наблюдалось набухание и покраснение наружных половых органов, повышенная возбудимость. Длительное скармливание контаминированных кормов привело к недополучению 60% приплода (замирание и мумификация плодов, аборт, выбраковка более 50% свиноматок и ремонтных свинок).

Наличие Т-2 токсина и фумонизина, в количествах превышающих МДУ стало причиной значительного падежа поросят 2-4-месячного возраста. Клиническая картина: наличие диарей, некрозы ушных раковин, хвоста и кожных покровов, выпадение прямой кишки. У всех павших животных отмечали поражения печени, даже среди поросят 3-5-дневного возраста с наличием очагов некроза, поражение желудочно-кишечного тракта, гастроэнтероколиты, диареи, нередко с примесью крови и слизи в фекалиях. Характерным признаком отравления фумонизином было наличие массовых пневмоний.

Скармливание кормов, загрязненных микотоксинами, является причиной клинического проявления микотоксикозов и приводит к значительному снижению резистентности организма, что способствует проявлению других инфекционных болезней свиней: колибактериоза, отечной болезни поросят, сальмонеллёза, пастереллёза, полисерозита и других, даже при проведении соответствующих вакцинаций.

В неблагополучных по дизентерии хозяйствах, при отравлении микотоксинами лечение противодизентерийными препаратами дает низкий терапевтический эффект, если не исключить токсичные корма из рациона.

АСПЕРГИЛЛЫ И ИХ МИКОТОКСИНЫ В ЗЕРНЕ КУКУРУЗЫ

Сухих Е.А.¹, Русанов В.А.², Солдатенко Н.А.¹, Фетисов Л.Н.¹

1 – ГНУ Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт

2 – ГНОУ ВПО Южный федеральный университет

Новочеркасск – Ростов-на-Дону

Одним из основных показателей санитарного качества кормов для животных является их пораженность грибами рода *Aspergillus*. Для определенных представителей рода *Aspergillus* установлена способность к биосинтезу афлатоксинов (*A.flavus*, *A.parasiticus*, *A.novinus*), стеригматоцистина (*A.versicolor*, *A.flavus*, *A.parasiticus*), патулина (*A.clavatus*). Состав микобиоты зерна кормовых культур находится в постоянной динамике, а следовательно меняется и спектр микотоксинов в кормах. В южном регионе России кукуруза в составе кормов для свиней и птицы занимает большую долю в зерновой составляющей комбикормов. В последние годы на юге России получили распространение позднеспелые сорта кукурузы, вследствие чего уборка часто проходит при неблагоприятных погодных условиях, зерно поступает на склады с повышенным содержанием влаги. Создаются подходящие условия для развития микромицетов. В данной работе представлены результаты мониторинга состава микобиоты и микотоксинов в образцах зерна кукурузы урожая 2006-2008 гг.

Объектом исследований были 81 образец зерна кукурузы, отобранные в хозяйствах Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краев. Первичное выделение грибов из зерна осуществляли на сусло-агаре, видовую идентификацию их проводили с использованием традиционных методов (Билай, Коваль, 1988; Андреюк и др., 1980; Саттон, Фотергилл, Ринальди, 2001). С помощью конкурентного иммуноферментного анализа (Ерошкин, Буркин, Кононенко, 2002) в экстрактах кормов определяли количество микотоксинов (мкг/кг корма), определяли процент положительных проб и процент проб, контаминированных микотоксинами в количествах выше минимально допустимого уровня (МДУ).

Установленный видовой состав микромицетов рода *Aspergillus* приведен в таблице 1.

Таблица 1.

Видовой состав микромицетов р. *Aspergillus* в зерне кукурузы

Виды грибов р. <i>Aspergillus</i>	Положительные пробы, %
<i>A.ochraceus</i> Wilhelm	25
<i>A. ustus</i> (Bain) Thom et Church	13
<i>A. niger</i> v. Tiegh	11
<i>A. repens</i> DB.	11
<i>A. candidus</i> Link	11
<i>A. ornatus</i> Raper, Kennel et Tresner	4
<i>A. fumigatus</i> Fres	4
<i>A. terreus</i> Thom	4
<i>A. pulverulentus</i> (Mc. Alp.) Thom	4
<i>Aspergillus</i> sp.	13

Из данных таблицы 1 следует, что наиболее часто выделяли *A.ochraceus* и *A.ustus*.

В таблице 2 представлены результаты определения содержания аспергиллотоксинов в образцах кукурузы.

Таблица 2. Уровень контаминации аспергиллотоксинами зерна кукурузы

Год исследований	Тип токсина					
	Афлатоксин В1		Стеригматоцистин		Охратоксин А1	
	% положительных проб	% проб с превышением МДУ	% положительных проб	% проб с превышением МДУ	% положительных проб	% проб с превышением МДУ
2006	46,87	9,38	18,75	0,0	21,88	15,63
2007	51,61	32,25	25,81	19,35	25,81	16,13
2008	44,44	33,33	22,22	11,11	44,44	27,77

Данные таблицы 2 показывают значительное присутствие афлатоксина В1 в представленных образцах (44-51% положительных проб), а также увеличение числа проб, содержащих этот токсин в количествах выше МДУ (более 20мкг/кг корма). Содержание охратоксина А1 возросло за указанный период в 2 раза. *A.ochraceus* и охратоксин А1 присутствуют не только в образцах кукурузы, но и в пробах комбикормов, в которые входит кукуруза (по нашим данным до 40% образцов комбикормов для свиней содержат охратоксин А1).

Выводы. 1. Около 50% образцов кукурузы контаминированы микромицетами рода *Aspergillus*, в том числе такими продуцентами микотоксинов как *A.ochraceus* .

2. Наблюдается нарастающая динамика присутствия в образцах кукурузы афлатоксина В1 и охратоксина А1.

О РАСПРОСТРАНЕНИИ АФЛАТОКСИНОВ

Танасева С.А., Садыкова В.Н., Титова В.Ю.

*Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных
Казань*

Микотоксикозы являются актуальной проблемой для животноводства России. Опасность среди них представляют дезоксиниваленол, Т-2 токсин, зеараленон, в последнее годы санитарное значение стали приобретать также афлатоксины, охратоксины, фумонизины. Афлатоксины являются токсичными веществами с сильно выраженными гепатотоксическими и канцерогенными свойствами.

Продуцентами афлатоксинов считаются микроскопические грибы *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*. Критическими факторами, определяющими рост микроскопических грибов и синтез афлатоксинов, является температура 27-28°C и влажность выше 18%.

Действие афлатоксинов на организм животных и человека может быть охарактеризовано с двух позиций. Во-первых, с точки зрения острого токсического действия и, во-вторых, с точки зрения оценки опасности отдаленных последствий. Острое токсическое действие афлатоксинов связано с тем, что они являются одними из сильных гепатотропных ядов, органом-мишенью которых является печень. Отдаленные последствия действия афлатоксинов проявляются в виде канцерогенного и тератогенного эффектов.

В течение 25 лет в нашем центре проводился мониторинг отчетов окружающей среды, ветеринарно-санитарного надзора на содержание микотоксинов. Для этого используются современные методы анализа, такие как ИФА, ВЭЖХ, хроматомассспектрометрия, ТСХ, позволяющие объективно оценить загрязненность их микотоксинами. Известно, что здоровье сельскохозяйственных животных, их продуктивность, воспроизводительная функция и биологическая ценность получаемых от них продуктов в значительной степени зависят от санитарного качества кормов.

За последние пять лет проведены исследования более 6 тысяч образцов проб, кормов и другой сельскохозяйственной продукции, отобранных из различных регионов РФ: Ростовской, Самарской, Саратовской, Нижегородской, Калужской и Белгородской, Липецкой областях, а также Республик Татарстан, Удмуртия, Башкортостан, Мордовия и Марий Эл. Наибольшее количество афлатоксинов обнаружено в пшенице - 0,6 мг/кг, закупленной из сельхозпредприятий Саратовской области; кукурузе - 0,2 мг/кг поступившей из Ростовской области; сенаже - 0,24 мг/кг, силосе кукурузном 0,36 мг/кг из Самарской области; подсолнечном и рапсовом жмыхе и шротах - 0,8 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,6 мг/кг, соответственно, доставленных из Нижегородской области; в комбикормах и гидролизных дрожжах - 0,23 и 0,31 мг/кг соответственно, поступивших из Липецкой области; ячмене 1,7 мг/кг из Калужской области. Большое количество афлатоксинов обнаружено в сенаже - 0,9 мг/кг, 0,85 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,64 мг/кг и комбикормах для птиц - 0,05-0,120 мг/кг отобранных районов РТ и Марий Эл.

Регионам неблагоприятным по санитарному качеству кормов, были даны рекомендации по рациональному их использованию, обезвреживанию и в отдельных случаях их утилизации.

ЭНТЕРОСОРБЕНТЫ – ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ БОРЬБЫ С МИКОТОКСИКОЗАМИ ЖИВОТНЫХ

Тарасова Е.Ю., Семенов Э.И., Мишина Н.Н., Тремасов М.Я., Иванов А.В.

ФГУ «ФЦТРБ – ВНИВИ»

Казань

С целью снижения негативного воздействия микотоксинов на организм человека и животных применяют разнообразные энтеросорбенты. В связи с этим идет постоянный поиск средств, которые не нарушают гомеостаз и выводят из организма продукты нарушенного метаболизма, жизнедеятельности патогенных микроорганизмов и токсических соединений, полученных из внешней среды.

Существуют как минеральные (углеродные, агроминеральные и др.), так и органические (на основе клеточных стенок дрожжей, растительных волокон и др.) адсорбенты. ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» имеет опыт работы с энтеросорбентами разной природы.

В качестве адсорбентов для микотоксинов рассмотрена возможность применения бентонитов (эффективность адсорбции Т-2 токсина *in vitro* при pH=7, 18-20°C бентонитом Биклянского месторождения Республики Татарстан - 51,0 ±3,93%, бентонитом Тарн-Варского месторождения Республики Татарстан - 61,6±2,09%). При увеличении температуры в среднем с 20-21°C до 38-39°C и pH 2 (условия близкие к желудочно-кишечному тракту), значительно (на 50-70%) увеличивается адсорбция Т-2 токсина такими сорбентами как Фитосорб, Микосорб, бентонит Биклянского месторождения.

Введение в рацион телят и поросят цеолита «Шантрашанит» в количестве 3% от общего количества корма при подостром Т-2 токсикозе повышает устойчивость животных к микотоксину, что проявляется менее выраженными клиническими признаками отравления, более быстрым выздоровлением и увеличением прироста массы тела, положительным влиянием на гематологические показатели.

Показана высокая сорбционная способность по отношению к Т-2 токсину *in vitro* и *in vivo* энтеросорбента «Зоокарб», а также древесного угля марки БАУ-А.

В качестве средства профилактики микотоксикозов ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» совместно с ООО «Маркорм» был разработан новый энтеросорбент Фитосорб (на основе клетчатки оболочки зерна злаков). В опытах на крысах применение фитосорба в количестве 0,5% от рациона при хроническом сочетанном Т-2 и афлатоксикозе снижает проявление токсического действия задаваемых микотоксинов, способствует сохранению функциональной активности ферментов, регуляции углеводного и минерального обменов, положительно влияет на гематологические и биохимические показатели. Исследования показали, что при pH среды 7 и температуре 37°C Фитосорб сорбирует 54,1% Т-2 токсина, а при pH среды 2 и температуре 37°C – 47,7%, не уступая по показателям сорбции энтеросорбенту Микосорб. Установлено, что применение энтеросорбента Фитосорб при Т-2 токсикозе норки оказывает выраженное защитное действие. Так в группе, получавшей Т-2 токсин в дозе 0,2 мг/кг корма, к концу опыта по сравнению с группой биологического контроля происходило достоверное уменьшение количества эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина и общего белка на 34,5; 63,4; 13,7 и 12,3% соответственно. В то же время в группе, получавшей Фитосорб, снижение данных параметров по сравнению с группой биологического контроля было ниже на 19,0; 28,8; 10,6 и 5,6% соответственно: животные были более активны, аппетит был сохранен.

С положительным эффектом при микотоксикозах испытаны новые энтеросорбенты совместного производства ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» и КГТУ на основе лигнина, ведутся работы по изысканию сорбентов на основе нанотехнологий.

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ВЕТЕРИНАРНОЙ МИКОТОКСИКОЛОГИИ

Тремасов М.Я., Семёнов Э.И., Иванов А.В.

*Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных
Казань*

Корма, загрязнённые вторичными продуктами жизнедеятельности микроскопических грибов – микотоксинами, представляют большую опасность для животных и человека. Микотоксины могут загрязнять практически все виды кормов, через продукцию животноводства попасть в организм человека. Они воздействуют почти на все органы и системы организма. Многие микотоксины обладают канцерогенными, мутагенными, тератогенными, эмбриотоксическими, аллергенными и иммуносупрессивными свойствами, способны снижать резистентность организма к инфекционным и незаразным болезням. Как показали исследования, проведённые в нашем Центре, за последние годы корма, доставленные из животноводческих предприятий, в которых происходили массовые заболевания и повышенный отход животных, от 10 до 65% поражались токсигенными грибами, до 40% выявлялась их токсичность, около 37,5% выявлялись микотоксины - преимущественно трихотецены, афлатоксины, патулин, реже-охратоксины. Практически в каждом втором случае падежа животных этиологическую роль играли микотоксины, чаще сочетания микотоксинов.

Средства профилактики и лечения микотоксикозов в условиях хозяйств часто не дают ожидаемого эффекта. Поэтому важной проблемой ветеринарной микотоксикологии является разработка средств и методов профилактики и лечения отравлений животных, мероприятий по повышению устойчивости организма к микотоксинам. Например, используемые в настоящее время энтеросорбенты производятся за рубежом, сохраняется зависимость от зарубежного производителя, они дорогостоящи, использование отечественных минеральных энтеросорбентов также ограничено. Для решения этой проблемы необходимо проведение научно-исследовательских работ по изучению молекулярного механизма действия микотоксинов, синтез и отбор потенциальных антидотных препаратов, отечественных энтеросорбентов и средств снижающих токсическое действие микотоксинов

Неотъемлемой составной частью профилактики токсикозов является мониторинг токсинов и микроскопических грибов в кормах, сельскохозяйственной и пищевой продукции, т.е. по всей пищевой цепочке человека. Важной задачей является разработка банка данных экотоксикантов, создание информационной сети для мониторинга, взаимосвязи со всеми её звеньями – от федерального до низшего звена, ветеринарными учреждениями всех уровней. Однако комплексный мониторинг в настоящее время не проводится, не разработана его система с соответствующей научно-технической документацией, экспрессными и высокочувствительными методами анализа, сетью информации, банком данных экотоксикантов, картами распространения токсических веществ. Для действенной системы мониторинга необходимо разработать как экспрессные, скрининговые, так и высокочувствительные и прецизионные методы анализа, не все существующие методы удовлетворяют этим требованиям, многие не адаптированы к условиям мониторинга, для некоторых микотоксинов не разработаны. Поэтому усовершенствование существующих, разработка новых тест-систем и методик индикации экотоксикантов является существенной проблемой для ветеринарной науки и практики. Недостаточно используется научный потенциал для разработки диагностических тестов на основе моноклональных антител.

В конечном счёте затраты на решение данных вопросов по применению комплекса мероприятий направленных на предотвращение и снижение ущерба от микотоксинов окупятся повышением эффективности животноводства, качества животноводческой продукции, противоэпизоотических мероприятий и снижением заболеваемости животных.

К ИЗУЧЕНИЮ ТОКСИЧЕСКИХ МЕТАБОЛИТОВ ASPERGILLUS FLAVUS LINK.

Харченко С.Н., Волощук Н.М.

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины

Чабаны – Киев, Украина

Согласно литературным данным *Aspergillus flavus* Link.- возбудитель микотоксикозов сельскохозяйственных животных, как при лабораторном культивировании, так и при поражении природных субстратов (зерно, зернофураж, грубые корма) характеризуется образованием таких токсических метаболитов как афлатоксины, коевая, аспергилловая кислоты.

Изучены морфолого-культуральные признаки 112 штаммов *A. flavus*, выделенных из различных субстратов и географических зон (Украина, Литва, Польша, Германия) на основании чего, исследуемые культуры разделены на пять основных типов и три полутипа.

Установлены особенности морфологии, связанные с формой и размером головки, строением стеригм, поверхностью оболочки спор.

У отобранных штаммов изучали образование афлатоксинов, коевой и аспергилловой кислоты, а также их антибиотические свойства против широкого набора тест-микроорганизмов (бактерий, мицелиальных грибов и дрожжей). Действия микотоксинов определяли с помощью метода бумажных дисков и методом разведений на средах, оптимальных для развития тестов: МПБ, Среды Чапека и Сабуро, жидкое и агаризованное сусло (7^0 по Баллингу), а также зерно кукурузы и хлебных злаков.

Результаты проведенных исследований позволяют отметить, что из числа полученных штаммов 10-14% являются продуцентами афлатоксинов, наиболее активное образование, которых наблюдалось при росте продуцентов на природных субстратах. Как правило, штаммы *A. flavus*, образующие афлатоксины, слабо продуцировали коевую и аспергилловую кислоты.

Большинство изученных штаммов *A. flavus* являются продуцентами коевой кислоты – 35% при росте грибов, как на синтетических, так и на природных средах, аспергилловую кислоту образовывали 27% культур.

Изученные токсигенные штаммы *A. flavus* имели невысокую антибиотическую активность против исследуемых тест-культур микроорганизмов (зоны угнетения роста тестов 5-10 мм).

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР, ПОРАЖАЕМЫХ ТОКСИГЕННЫМИ ГРИБАМИ РОДА FUSARIUM LINK.

Харченко С.Н., Башта Е.В.

*Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины
Киев, Украина*

В практике санитарной экспертизы кормов для определения токсичности зерна хлебных злаков и продуктов их переработки применяются преимущественно биологические методы (биопроба на коже кролика, а также кормление лабораторных животных).

В ряде случаев эти методы не дают достоверных результатов, особенно при определении качества слаботоксического зерна в связи с тем, что дерматологическая реакция на депелированной коже проводится со свободными липидами, извлекаемыми из зерна диэтиловым эфиром. Между тем, токсины накапливаются и в связанных липидах в виде липопротеидных комплексов.

Разработан новый физико-химический качественный и количественный метод определения токсичности зерна пшеницы, ржи, ячменя, овса, проса пораженных фузариями. Качественный метод основан на обнаружении в исследуемых липидах (свободных и связанных) люминисцирующих в УФ-свете токсических фракций с Rf 0,06 и 0,22 при разделении их методом бумажной или тонкослойной хроматографий на силикагеле.

Количественный метод основан на выделении этих фракций из фузариозного зерна препаративной хроматографией на силикагеле и определении содержания токсических стеролов фотоколориметрически с использованием цветной реакции Либермана-Бурхарда.

Проверка метода на различных образцах токсичного и слаботоксического зерна разных видов злаковых культур, пораженных разными видами грибов рода *Fusarium Link.* (*F. Sporotrichiella*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. sambucinum*), показала, что он дает полностью совпадающие результаты с дерматонекротическими биопробами на коже кролика с применением разных концентраций Т-2 токсина (продуцент *F. sporotrichiella* 21275).

Метод вполне достоверен, несложен в выполнении, не требующий специальной аппаратуры и дорогостоящих реактивов. Он может использоваться как экспресс-метод определения токсичности фузариозного зерна.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИХОТЕЦЕНОВЫХ МИКОТОКСИНОВ ГРУППЫ А.

Эллер К.И., Седова И.Б., Захарова Л.П., Селифанов А.В.

ГУ НИИ питания РАМН

Москва

Актуальность проблемы загрязнения зерновых трихотеценовыми микотоксинами (ТТМТ) группы А (Т-2 токсин, НТ-2 токсин) обуславливается их высокой токсичностью и широкой распространенностью грибов-продуцентов. В России установлена ПДК Т-2 токсина в зерновых на уровне 0,1 мг/кг. Исследование распространенности и оценка реальной нагрузки ТТМТ группы А сдерживаются сложностью и труднодоступностью достоверных методик определения, особенно при низких уровнях (менее 0,1 мг/кг) загрязнения.

Целью данной работы являлось сравнение трёх используемых в последнее время методических подходов к определению ТТМТ группы А в зерновых: иммуноферментный анализ (ИФА, RIDASCREEN® Т-2 токсин, R-Biopharm, ООО «Стайлаб»); высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с применением иммуноаффинной (ИАФ, колонки EASI-extract Т-2@НТ-2, R-Biopharm, ООО «Стайлаб») хроматографической очистки и флуориметрическим детектированием после предварительного получения 9-антроил-производных ТТМТ (ВЭЖХ-ФЛУ) и разработанная нами модификация методики с использованием ИАФ-очистки и ВЭЖХ экстрактов с масс-спектрометрическим детектированием без предварительной дериватизации (ВЭЖХ-МС).

Условия ВЭЖХ-МС: колонка Phenomenex Luna C18(2), 150×4,6 мм, 5 мкм. Подвижная фаза – смесь ацетонитрил - вода, подкисленная трифторуксусной кислотой до pH 3,0 (4:6). МС-детектор с электроспрэй-ионизацией и ионной ловушкой. Диапазон сканирования молекулярных масс от 400 до 600 m/z. В масс-спектре стандартов ТТМТ молекулярные ионы (МН) и ионы аддуктов с натрием (М+23) имели малую интенсивность, наибольшую интенсивность давали аддукты Т-2 и НТ-2 токсинов с ионами калия (М+39) с молекулярными массами – 505,0 и 463,0 соответственно, по сумме которых и проводился мониторинг. Предел обнаружения Т-2 и НТ-2 в этих условиях составил 0,002 и 0,005 мг/кг соответственно.

Параметры ВЭЖХ-ФЛУ: неподвижная фаза – колонка Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 150×4,6 мм, 5 мкм. Подвижная фаза – градиентное элюирование смесью ацетонитрила (А) и воды (В) от 70 до 100% А. Предел обнаружения по Т-2 токсину – 0,03 мг/кг.

Проведенное исследование показало, что методика ВЭЖХ-ФЛУ дает удовлетворительные результаты только при определении Т-2 токсина при его присутствии на уровне выше 0,03 мг/кг. Несмотря на селективную ИАФ-очистку, производное НТ-2 токсина не удается определить из-за наложения при ВЭЖХ компонентов матрикса образца и побочных продуктов дериватизации. Принимая во внимание трудоемкость, недостаточную селективность и более низкую чувствительность, метод ВЭЖХ-ФЛУ существенно уступает методике ВЭЖХ-МС.

Методика ВЭЖХ-МС давала достоверные результаты на контрольных образцах зерна, загрязненных Т-2 и НТ-2 токсинами на уровне от 0,005 мг/кг, что свидетельствует о высокой селективности и чувствительности методики.

Разработанная ВЭЖХ-МС методика была использована для подтверждения результатов скрининга суммы трихотеценов группы А, проведенного с помощью тест-системы для ИФА RIDASCREEN Т-2 токсин в 83 пробах продовольственного зерна отечественного производства урожая 2007 г. Согласно данным ИФА, все исследованные пробы содержали трихотецены группы А в количестве от 0,007 до 0,338 мг/кг. С помощью ВЭЖХ-МС методики наличие Т-2 и НТ-2 токсинов было подтверждено только в образцах с уровнем загрязнения по данным ИФА выше 0,03 мг/кг. Корреляция данных ИФА с результатами ВЭЖХ-МС была выше в случае модификации условий проведения ИФА за счет использования при калибровке стандартов токсинов в растворах экстракта зерновых, а не в чистых водных растворах.

Таким образом, проведенное исследование показало, что наиболее целесообразным при проведении мониторинга загрязнения ТТМТ зерновых на уровне выше 0,03 мг/кг является использование модифицированной методики ИФА при обязательном подтверждении положительных результатов данными ВЭЖХ-МС анализа.

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В ВЕТЕРИНАРНОЙ МИКОЛОГИИ

Маноян М.Г., Панин А.Н., Овчинников Р.С.

ФГУ «ВГНКИ»

Москва

В конце прошлого – начале нынешнего столетия во многих странах мира был отмечен существенный рост заболеваемости микозами человека и животных. При этом значительно расширился видовой состав возбудителей, а также клиническое разнообразие заболеваний. Это повлекло за собой необходимость оптимизации методов диагностики и терапии микозов. Грибковые заболевания, длительное время находившиеся на периферии медицины (как гуманной, так и ветеринарной), в настоящее время приобрели особую актуальность, и рассматриваются как «болезни 21-го века».

Для эффективной борьбы с микозами животных необходимо знание и понимание тех тенденций, которые в настоящее время имеют место в ветеринарной микологии. В качестве основных, на наш взгляд, необходимо выделить следующие. 1. Изменение этиологии и клинических проявлений «классических» микозов (дерматофитозов); 2. Повышение социальной значимости микозов животных, их влияния на микологическое благополучие человека; 3. Резко возросшее количество «оппортунистических» микозов, вызываемых потенциально патогенными грибами на фоне снижения резистентности макроорганизма; 4. Распространение возбудителей, ранее не встречавшихся в нашей климатической зоне; 5. Расширение видового состава домашних животных, в т.ч. экзотических; 6. Возросшее значение в терапии микозов фармацевтических антимикотиков и иммуномодуляторов. 7. Необходимость объединения усилий ветеринарных и медицинских служб в борьбе с микозами, общими для человека и животных.

Длительное время внимание ветеринарных микологов было сфокусировано почти исключительно на дерматофитозах. Интенсивные исследования позволили разработать широкий спектр вакцин против этих заболеваний, эффективных как для профилактики, так и для терапии. Однако дерматофитозы не потеряли своей актуальности и по сей день, они по-прежнему широко распространены как среди продуктивных животных, так и среди домашних животных-компаньонов. Этиологическая структура дерматофитозов нестабильна, и в настоящее время наблюдается тревожная тенденция доминирования в этиологии зооантропофильных видов над зоофильными. Так, по данным отдела ветеринарной микологии ФГУ «ВГНКИ», в этиологии дерматофитозов лошадей в московском регионе доминируют виды *Microsporium canis* и *M. gypseum*, вместо преобладавших ранее специфичных для лошадей видов *Trichophyton equinum* и *M. equinum* (М. Маноян et al., 2008). В силу этих изменений вероятность заражения дерматофитозом человека при контакте с больными животными многократно увеличивается.

Также в последние годы отмечены изменения в клиническом проявлении дерматофитозов животных. Типичные проявления «стригущего лишая» (четко очерченные округлые алопеции, покрытые корочками) встречаются в ветеринарной практике всё реже. Клиника часто носит стёртый неспецифичный характер, может напоминать картину других заболеваний. Помимо этого наблюдаются случаи нетипичной локализации патологического процесса, например дерматофитозы когтей у собак и кошек. В силу этих факторов основное значение в диагностике приобретает культуральный микологический анализ, в то время как люминесцентный и микроскопический методы диагностики отходят на второй план.

Однако клинически выраженные дерматофитозы – лишь вершина айсберга, основание которого составляют скрытые (бессимптомные) миконосители. У животных-миконосителей споры грибов-дерматофитов находятся на кожном покрове в покоящемся состоянии, не вызывая клинически выраженного заболевания, однако сохраняя свой патогенный потенциал. Животное может оставаться бессимптомным миконосителем неопределенно долгое время, не проявляя клинических признаков заболевания, однако представляя опасность для заражения других животных и человека. Кроме того, животные-миконосители являются источником контаминации внешней среды, помещений и предметов обихода, а также воздуха, создавая тем самым стационарный очаг заболевания. Люди, контактирующие с животными-миконосителями (владельцы домашних животных, персонал конюшен, звероводческих и сельскохозяйственных предприятий) подвергаются постоянному риску заражения дерматофитозом. Таким образом,

животные-миконосители являются основным вектором распространения дерматофитозов как среди животных, так и среди людей, что обуславливает социальную значимость данной проблемы. По данным зарубежных авторов, количество животных-миконосителей среди кошек достигает 75-88%, среди собак – 36-66%, среди кроликов, грызунов – 26-61%, среди крупного рогатого скота – 59% (G. Caretta et al., 1989, M. Ali-Stayeh et al., 1988, M. Sympania et al., 1996, M. Gallo et al., 2005, M. Otcenasek et al., 1980). Диагностика скрытого миконосительства возможна только путем лабораторного микологического анализа образцов шерстного покрова животного (по методу McKenzie или аналогичному). Для выявления животных-миконосителей целесообразно введение обязательного микологического контроля животных при проведении кинологических и фелинологических выставок (где чаще всего происходит инфицирование животных), при межрегиональных перевозках, при продаже животных через зоомагазины, клубы и питомники. Также аналогичный контроль необходим для животных, содержащихся на базе спортивных, образовательных, развлекательных и иных учреждений, где предполагается регулярный контакт животных и людей.

Одной из важнейших тенденций ветеринарной микологии последних десятилетий стало распространение оппортунистических микозов, вызываемых потенциально патогенными грибами на фоне снижения резистентности макроорганизма. Возбудителями оппортунистических микозов являются убиквитарные грибы-сапротрофы или комменсалы, повсеместно распространенные во внешней среде, а также в биотопах организма животного. Патогенный потенциал к настоящему времени обнаружен у более чем 300 видов грибов, ранее считавшихся безвредными для человека и животных (G. De Hoog et al., 2000). Исследования, проведенные в ФГУ «ВГНКИ», продемонстрировали, что у ряда видов животных грибы-оппортунисты превалируют над дерматофитами в этиологии кожных поражений. Так, у собак дерматофитозы диагностированы в 11% случаев, оппортунистические микозы – в 35%. У лошадей эти показатели составили 23% и 44% соответственно (Овчинников Р.С., 2008). Авторы в разных регионах РФ отмечают тенденцию к распространению оппортунистических микозов животных (Тугунова Т.Б. (2004), Никитушкина Н.А. (2008), Бутковский В. и др. (2008), и другие).

Отдельную группу оппортунистических микозов представляют заболевания, вызываемые липофильными дрожжевыми грибами рода *Malassezia*. Этиологическая роль этих грибов в заболеваниях животных установлена относительно недавно (V. Sanguenti et al., 1984, E. Cuttin et al., 1985), однако на сегодня *Malassezia*-инфекции представляют весьма существенную проблему в ветеринарной микологии. Как и другие грибы-оппортунисты, представители рода *Malassezia* не являются «истинными» патогенами, и обитают на кожном покрове многих видов млекопитающих в качестве комменсалов.

Лабораторная диагностика *Malassezia*-инфекций имеет ряд существенных особенностей, обусловленных липофильными свойствами возбудителей, их низкой жизнеспособностью во внешней среде, прихотливостью при культивировании *in vitro*. Как и при других оппортунистических микозах, при малассезиозах необходимо не только обнаружить потенциально патогенный гриб, но и интерпретировать его этиологическую значимость, т.к. грибы-оппортунисты часто обнаруживаются и у здоровых животных. Практичный метод диагностики *Malassezia*-инфекций, применимый в повседневной практике, был предложен относительно недавно (П.П. Ершов, 2004). На основе этого метода в ФГУ «ВГНКИ» были разработаны методические указания по диагностике этих микозов, к настоящему времени внедренные в практику ряда ветеринарных учреждений РФ. Проведенные нами мониторинговые исследования выявили широкую распространенность *Malassezia*-инфекций у домашних животных: этиологическая роль грибов рода *Malassezia* при отитах у собак составила 80%, при дерматитах у собак – 14%, при отитах у кошек – 11%.

В последние годы заметно расширился видовой состав домашних животных, с которыми приходится иметь дело ветеринарным специалистам. Резко возрос интерес к содержанию экзотических животных – приматов, грызунов, птиц, рептилий. Распространились новые породы собак и кошек, часто характеризующиеся сниженным иммунитетом. Вместе с новыми видами животных, ветеринарам приходится сталкиваться и с новыми возбудителями болезней. Так, особенно остро в ветеринарной практике стоит вопрос микозов рептилий, т.к. холоднокровные животные имеют естественную предрасположенность к инфекционным заболеваниям, а

неадекватные условия содержания создают дополнительные предпосылки к заболеванию микозами. В отличие от млекопитающих, у рептилий поверхностные микозы легко переходят в глубокую форму, что без своевременного вмешательства часто приводит к летальному исходу.

Экзотические животные, зачастую ввозимые в РФ нелегально, во многом обуславливают экспансию возбудителей микозов, не характерных для нашей климатической зоны. Другой фактор расширения ареала эндемичных видов грибов – глобальное потепление климата. Так, в последние годы от рептилий нами были выделены грибы рода *Chrysosporium*, характерные для тропических регионов. Эти кератинофильные грибы способны поражать как животных, так и человека. У лошадей в московском регионе был диагностирован дерматофилез – заболевание, вызываемое актиномицетом *Dermatophilus congolensis*; от кошек и собак были выделены актиномицеты рода *Nocardia*. Ранее данные возбудители на территории РФ не встречались.

В современных условиях требует оптимизации подход к терапии микозов животных. Имея широкий арсенал вакцин для профилактики и терапии дерматофитозов, ветеринары крайне ограничены в выборе фармацевтических антимикотиков, необходимых для терапии оппортунистических микозов и борьбы со скрытым миконосительством. Эффективные антифунгальные препараты, используемые в медицине, не имеют аналогов для применения в ветеринарии. Ветеринары вынуждены использовать их неофициально, исходя из собственного практического опыта. Ощущается нехватка антимикотиков в форме шампуней, спреев, незаменимых при терапии скрытого миконосительства, генерализованных форм дерматофитозов и *Malassezia*-инфекций. При терапии оппортунистических микозов стоит задача не только элиминировать возбудителя, но и стимулировать иммунную систему животного для самостоятельного противодействия инфекционному агенту. Однако выбор иммуномодуляторов, предназначенных для использования в ветеринарии, также очень ограничен. Внедрение в ветеринарную практику современных антимикотиков и иммуномодуляторов – насущная задача ближайшего будущего.

Задачи, стоящие сегодня перед ветеринарной микологией, имеют большое значение также и для обеспечения благополучия человека, и требуют объединения усилий научных организаций, медицинских и ветеринарных служб, содействия административных структур.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИММУНОСТИМУЛЯТОРОВ НА ТЕЧЕНИЕ СМЕШАННОГО Т-2-АФЛАТОКСИКОЗА ЖИВОТНЫХ

Семёнов Э.И., Тремасов М.Я., Валиев А.Р.

*Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных
Казань*

Для профилактики микотоксиозов. интерес вызывает использование сорбентов и веществ, повышающих общую резистентность организма. Часто микотоксиозы протекают сочетано с бактериальными и вирусными инфекциями. Некоторые авторы рассматривают иммуносупрессию в результате длительного воздействия микотоксинов как одну из форм микотоксиноза имеющую возможно более практическое значение, чем острые формы. Одним из способов поддержания нормального функционирования иммунной системы и восстановления иммунитета при иммунодефицитных состояниях является применение иммуномодуляторов.

Настоящая работа касается изыскания и изучения возможности применения различных иммуностимуляторов при смешанном Т-2-афлатоксикозе животных и для усиления профилактического действия сорбентов т.к. результаты ранее проведённых исследований на лабораторных и сельскохозяйственных животных показали эффективность энтеросорбентов, однако, даже при выраженном профилактическом эффекте сорбентов у животных происходило снижение показателей неспецифической резистентности животных.

Опыты проведены на 48 белых крысах в течение 15 суток. Животным первой группы вводили Т-2 токсин и афлатоксин В₁ в виде 5% спиртового раствора внутривентрикулярно, в дозах 1/10 ЛД₅₀. Крысам второй группы вводили микотоксины в аналогичной дозе и внутрь иммуностимулятор левамизол в дозе 4 мг/кг массы тела в течение 3 дней, после 4-х дневного перерыва, вновь выпаивали препарат в течение 3 дней. Животным третьей группы - микотоксины и дибазол внутрь в дозе 6 мг/кг массы тела ежедневно. Четвертой группе крыс вводили внутривентрикулярно микотоксины и димефосфон в дозе 90 мг/кг массы ежедневно.

В качестве параметров контроля течения токсикоза служили клинические признаки, гематологические показатели, содержание МДА и показатели неспецифической резистентности крыс. Исследуемые показатели сравнивали с фоновыми.

Изменение гематологических показателей регистрировалось во всех группах. Так, в первой группе количество эритроцитов на 15 сутки уменьшалось на 21,3%; количество лейкоцитов - на 23,9%; содержание гемоглобина на 13,7%. Во второй группе снижение эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина составило 20,2; 22,5 и 12,4% соответственно. В третьей группе 19,4; 20,5 и 11,5% соответственно. В четвёртой группе - на 16,9; 15,8 и 8,7% соответственно. Наибольшее увеличение МДА было в первой группе на 27,0%, во второй группе - 23,0%; в третьей - 25,2%; и наименьшее увеличение в четвёртой группе на 16,4%. Лизоцимная активность у животных в первой группе снижалась к 15 сут на 9,4%; во второй группе на 8,1%; в третьей - и 8,1%; в четвёртой - на 7,9%. Фагоцитарная активность снизилась в первой группе на 12%, во второй - на 6,9% (p<0,05), в третьей - на 4,4%, в четвёртой - на 1,6% (p>0,05). Фагоцитарное число в первой группе уменьшалось на 13,1%, во второй группе на 5,3%, в третьей - на 3,05%, в четвёртой - увеличивалось на 1,6%. Фагоцитарная ёмкость в первой группе закономерно снижалась 32,6%; во второй группе 25,4%. в третьей - на 22,6%, в четвёртой - 14,9%.

Таким образом, результаты проведенных исследований, а также наблюдения за подопытными животными, свидетельствуют о том, что наиболее выраженным защитным эффектом при подострой интоксикации Т-2 токсином и афлатоксином В₁ обладает димефосфон. Оценивая полученные результаты, также можно заключить, что проведенные исследования имеют перспективу продолжения их с целью усовершенствования средств защиты животных при микотоксинозах животных.

ЭНТЕРОСОРБЕНТЫ – ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ БОРЬБЫ С МИКОТОКСИКОЗАМИ ЖИВОТНЫХ

Тарасова Е.Ю., Семенов Э.И., Мишина Н.Н., Тремасов М.Я., Иванов А.В.

ФГУ «ФЦТРБ – ВНИВИ»

Казань

С целью снижения негативного воздействия микотоксинов на организм человека и животных применяют разнообразные энтеросорбенты. В связи с этим идет постоянный поиск средств, которые не нарушают гомеостаз и выводят из организма продукты нарушенного метаболизма, жизнедеятельности патогенных микроорганизмов и токсических соединений, полученных из внешней среды.

Существует как минеральные (углеродные, агроминеральные и др.), так и органические (на основе клеточных стенок дрожжей, растительных волокон и др.) адсорбенты. ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» имеет опыт работы с энтеросорбентами разной природы.

В качестве адсорбентов для микотоксинов рассмотрена возможность применения бентонитов (эффективность адсорбции Т-2 токсина *in vitro* при pH=7, 18-20°C бентонитом Биклянского месторождения Республики Татарстан - 51,0 ±3,93%, бентонитом Тарн-Варского месторождения Республики Татарстан - 61,6±2,09%. При увеличении температуры в среднем с 20-21°C до 38-39°C и pH 2 (условия близкие к желудочно-кишечному тракту), значительно (на 50-70%) увеличивается адсорбция Т-2 токсина такими сорбентами как Фитосорб, Микосорб, бентонит Биклянского месторождения.

Введение в рацион телят и поросят цеолита «Шантрашанит» в количестве 3% от общего количества корма при подостром Т-2 токсикозе повышает устойчивость животных к микотоксину, что проявляется менее выраженными клиническими признаками отравления, более быстрым выздоровлением и увеличением прироста массы тела, положительным влиянием на гематологические показатели.

Показана высокая сорбционная способность по отношению к Т-2 токсину *in vitro* и *in vivo* энтеросорбента «Зоокарб», а также древесного угля марки БАУ-А.

В качестве средства профилактики микотоксикозов ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» совместно с ООО «Маркорм» был разработан новый энтеросорбент Фитосорб (на основе клетчатки оболочки зерна злаков). В опытах на крысах применение Фитосорба в количестве 0,5% от рациона при хроническом сочетанном Т-2 и афлатоксикозе снижает проявление токсического действия задаваемых микотоксинов, способствует сохранению функциональной активности ферментов, регуляции углеводного и минерального обменов, положительно влияет на гематологические и биохимические показатели. Исследования показали, что при pH среды 7 и температуре 37°C Фитосорб сорбирует 54,1% Т-2 токсина, а при pH среды 2 и температуре 37°C – 47,7%, не уступая по показателям сорбции энтеросорбенту Микосорб. Установлено, что применение энтеросорбента Фитосорб при Т-2 токсикозе норок оказывает выраженное защитное действие. Так в группе, получавшей Т-2 токсин в дозе 0,2 мг/кг корма, к концу опыта по сравнению с группой биологического контроля происходило достоверное уменьшение количества эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина и общего белка на 34,5; 63,4; 13,7 и 12,3% соответственно. В то же время в группе, получавшей Фитосорб, снижение данных параметров по сравнению с группой биологического контроля было ниже на 19,0; 28,8; 10,6 и 5,6% соответственно: животные были более активны, аппетит был сохранен.

В настоящее время в ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» ведется работа по изысканию и разработке сорбентов на основе нанотехнологий для профилактики и лечения токсикозов различной природы, снижения техногенного прессинга на организм человека и животных.

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ВЕТЕРИНАРНОЙ МИКОТОКСИКОЛОГИИ

Тремасов М.Я., Семёнов Э.И., Иванов А.В.

*Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных
Казань*

Корма, загрязнённые вторичными продуктами жизнедеятельности микроскопических грибов – микотоксинами, представляют большую опасность для животных и человека. Микотоксины могут загрязнять практически все виды кормов, через продукцию животноводства попасть в организм человека. Они воздействуют почти на все органы и системы организма. Многие микотоксины обладают канцерогенными, мутагенными, тератогенными, эмбриотоксическими, аллергенными и иммуносупрессивными свойствами, способны снижать резистентность организма к инфекционным и незаразным болезням. Как показали исследования, проведённые в нашем Центре, за последние годы корма, доставленные из животноводческих предприятий, в которых происходили массовые заболевания и повышенный отход животных, от 10 до 65% поражались токсигенными грибами, до 40% выявлялась их токсичность, около 37,5% выявлялись микотоксины - преимущественно трихотецены, афлатоксины, патулин, реже-охратоксины. Практически в каждом втором случае падежа животных этиологическую роль играли микотоксины, чаще сочетания микотоксинов.

Средства профилактики и лечения микотоксикозов в условиях хозяйств часто не дают ожидаемого эффекта. Поэтому важной проблемой ветеринарной микотоксикологии является разработка средств и методов профилактики и лечения отравлений животных, мероприятий по повышению устойчивости организма к микотоксинам. Например, используемые в настоящее время энтеросорбенты производятся за рубежом, сохраняется зависимость от зарубежного производителя, они дорогостоящи, использование отечественных минеральных энтеросорбентов также ограничено. Для решения этой проблемы необходимо проведение научно-исследовательских работ по изучению молекулярного механизма действия микотоксинов, синтез и отбор потенциальных антидотных препаратов, отечественных энтеросорбентов и средств снижающих токсическое действие микотоксинов

Неотъемлемой составной частью профилактики токсикозов является мониторинг токсинов и микроскопических грибов в кормах, сельскохозяйственной и пищевой продукции, т.е. по всей пищевой цепочке человека. Важной задачей является разработка банка данных экотоксикантов, создание информационной сети для мониторинга, взаимосвязи со всеми её звеньями – от федерального до низшего звена, ветеринарными учреждениями всех уровней. Однако комплексный мониторинг в настоящее время не проводится, не разработана его система с соответствующей научно-технической документацией, экспрессными и высокочувствительными методами анализа, сетью информации, банком данных экотоксикантов, картами распространения токсических веществ. Для действенной системы мониторинга необходимо разработать как экспрессные, скрининговые, так и высокочувствительные и прецизионные методы анализа, не все существующие методы удовлетворяют этим требованиям, многие не адаптированы к условиям мониторинга, для некоторых микотоксинов не разработаны. Поэтому усовершенствование существующих, разработка новых тест-систем и методик индикации экотоксикантов является существенной проблемой для ветеринарной науки и практики. Недостаточно используется научный потенциал для разработки диагностических тестов на основе моноклональных антител.

В конечном счёте затраты на решение данных вопросов по применению комплекса мероприятий направленных на предотвращение и снижение ущерба от микотоксинов окупятся повышением эффективности животноводства, качества животноводческой продукции, противоэпизоотических мероприятий и снижением заболеваемости животных.

НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ОВЕЦ ПРИ КАНДИДОЗЕ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ И ПРИМЕНЕНИИ ПРЕПАРАТА ДС-2

Тремасов Ю.М., Матросова Л.Е., Степанов В.И., Ахметов Ф.Г.

ФГУ «ФЦТРБ – ВНИВИ»

Казань

Развитие животноводства и повышение продуктивности животных на сельскохозяйственных предприятиях, зависит от различных факторов, среди которых большое значение имеют различные заболевания, приносящие существенный экономический ущерб. Среди болезней большое место занимают эндометриты. В этой связи актуальным являются разработка эффективных препаратов для профилактики и лечения этих болезней.

В ФГУ «ФЦТРБ - ВНИВИ», на основе серосодержащих соединений и иммуномодуляторов разработано средство для лечения эндометритов животных – ДС-2 (эндометрин 2). Препарат проявляет высокую фунгицидную и фунгистатическую активность в отношении грибов рода *Candida*.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния ДС-2 на некоторые показатели неспецифической резистентности овец, больных кандидозом.

Опыты проведены на овцах массой 40 - 45 кг, разделенных по принципу аналогов на 2 группы (n=3). Овцам первой группы внутриматочно однократно вводили ДС-2 в лечебной дозе, равной 0,2 мл/кг массы тела; вторая группа животных служила контролем.

До введения препарата и на 5, 10, 15, 20 и 30 сутки общепринятыми методами проводили исследование крови на содержание лейкоцитов, общего белка и его фракций, фагоцитарную активность нейтрофилов, активность лизоцима.

На 15 и 20 сутки после введение овцам ДС-2 отмечалось повышение количества общего белка на 8 и 12 % соответственно. Количество альбуминов снижалось на 5 и 18 % на 10 и 15-е сутки. Изменения в концентрации α -глобулинов носили перемежающийся характер. Так, через сутки после введения препарата содержание α -глобулинов увеличивалось на 22 %, через трое суток - уменьшалось на 40 % ($P<0,001$), на 10, 15 и 20-е сутки количество их увеличивалось на 10, 25 и 20 % ($P<0,001$) соответственно.

Содержание β -глобулинов было повышено на 35, 32 и 35 % ($P<0,001$) на 5, 10 и 15 сут. после введения ДС-2. Концентрация γ -глобулинов также повышалась на 28, 40 и 28 % ($P<0,001$) через 5, 10 и 15 сут. после применения препарата.

При применении ДС-2 общее количество лейкоцитов варьировало на уровне фоновых величин. Фагоцитарная активность увеличивалась через 10, 15 и 20 сут., на 10, 15 и 22 %, фагоцитарный индекс - на 27, 20 и 28 %. Фагоцитарное число и фагоцитарная емкость лейкоцитов через сутки повышались на 50 и 30 % ($P<0,001$), через 5 сут. - 30 и 32 % ($P<0,001$), через 10 сут. - 20 и 27 % ($P<0,001$), через 20 сут. — 25 и 35 % ($P<0,001$) соответственно. После введения препарата через 5 суток активность лизоцима повышалась на 24 % ($P<0,01$), на 10 и 20 сутки активность ферментов превышала фоновый уровень на 10 и 12 % соответственно.

У контрольных животных на протяжении всего периода исследований отмечалось повышенное количество лейкоцитов, снижение количества общего белка, белковых фракций, показателей неспецифической резистентности.

Иммуностимулирующее действие ДС-2 при кандидозе овец характеризуется повышением фагоцитарной активности нейтрофилов, лизоцимной активности и других показателей неспецифической резистентности животных.

СПОСОБНОСТЬ ИЗОЛЯТОВ *FUSARIUM AVENACEUM* БИОСИНТЕЗИРОВАТЬ ЭННИАТИНЫ

Соколова Г.Д.¹, Малиновская Л.С.², Гагкаева Т.Ю.³, Девяткина Г.А.¹

¹ – ВНИИ фитопатологии

² – ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии

³ – ВИЗР

Москва – Пушкин

Fusarium avenaceum принадлежит к числу наиболее распространенных видов фитопатогенных грибов рода *Fusarium*, паразитирующих на зерновых культурах. Считалось, однако, что этот гриб обладает меньшей патогенностью по сравнению с видами *F.graminearum* и *F.culmorum* – продуцентами микотоксинов дезоксиниваленола и зеараленона.

В конце XX и начале XXI веков в Европе появились сообщения о высокой встречаемости, а в ряде случаев о доминировании вида *F. avenaceum* в фитопатогенном комплексе, связанном с фузариозом колоса в эпифитотийных ситуациях. Кроме того, среди метаболитов этого гриба были найдены энниатины и боверицин – микотоксины из класса циклогексадепсипептидов, количество которых в зараженном зерне превышало другие известные метаболиты, в частности монилиформин (Uhlig et al., 2006, 2007). Согласно некоторым оценкам энниатины А, В и боверицин по цитотоксичности сравнимы с дезоксиниваленолом (Ivanova et al., 2006)

Целью нашей работы было оценить способность российских изолятов *F. avenaceum* к биосинтезу энниатинов и боверицина. Изоляты *F. avenaceum* были выделены с зерна пшеницы, ячменя или ржи из разных областей Северо-Западного и Центрального федеральных округов – основных ареалов распространения вида *F. avenaceum*. Из них 10 изолятов были предоставлены Малиновской Л.С. (ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии), 5 изолятов Гагкаевой Т.Ю. (ВИЗР) и 3 изолята были взяты из коллекции ВНИИ фитопатологии.

Изоляты грибов культивировали 4 недели в темноте при 26⁰С на 20 г автоклавированного зерна пшеницы. Из полученной после инкубации биомассы метаболиты гриба экстрагировали метанолом. После очистки экстракта на колонке и тонком слое содержание циклогексадепсипептидов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

В качестве стандарта использовали коммерческий образец энниатина В фирмы Alexis biochemicals. Для идентификации энниатинов В₁, А, А₁ и боверицина применяли выделенные нами ранее в твердом виде боверицин и смесь энниатинов, изученные по хроматографической подвижности на тонком слое, поведению в условиях ВЭЖХ, а также с использованием методов ЯМР ¹Н и масс-спектрометрии, что позволило соотнести пики ВЭЖХ с определенной разновидностью энниатинов или с боверицином.

Как оказалось, все 18 изученных изолятов *F. avenaceum* в условиях опыта синтезировали энниатин В₁ в количестве от 30 до 194 мкг/г сухой биомассы, из них 7 изолятов продуцировали еще и энниатин В (11 – 857 мкг/г). В биомассе 4 изолятов были обнаружены энниатины А (9-165 мкг/г) и А₁ (10 - 40 мкг/г), причем в смеси с энниатинами группы В. Боверицин был найден в следовых количествах в биомассе 3 изолятов.

Наибольшей токсигенностью отличались 2 изолята, один из которых был выделен с зерна пшеницы из Ленинградской области и продуцировал смесь энниатинов В, В₁, А и А₁, а другой – с зерна ячменя из Курской области и синтезировал энниатины В и В₁. При этом количество энниатина В в смесях преобладало.

Полученные результаты оценки небольшой выборки изолятов *F. avenaceum* показали способность данного вида продуцировать циклогексадепсипептиды, в связи с чем существует вероятность загрязнения зерна представителями этого класса микотоксинов в случае эпифитотий фузариоза колоса с доминированием *F. avenaceum* в фитопатогенном комплексе.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У СОБАК, ПРИВИТЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВАКЦИНОЙ ПРОТИВ ДЕРМАТОФИТОЗОВ ЖИВОТНЫХ

Ханис А.Ю., Гафурова А.М.

Профилактическая и вынужденная (лечебная) иммунизация собак против микроспории и трихофитии имеет большое значение в комплексе мер борьбы с дерматофитозами животных и человека. Поэтому изучение длительности и напряженности поствакцинального иммунитета является важным практическим аспектом.

В микологической практике, для изучения постинфекционного и поствакцинального иммунитета при дерматофитозах применяются различные методы инфицирования подопытных животных (1, 2, 3, 4).

Нами с целью изучения поствакцинального иммунитета у животных, вакцинированных экспериментальной вакциной, был использован метод контактного заражения, так как считаем его наиболее приближенным к естественным условиям передачи возбудителя.

В опытах использовали 31 собаку различных пород и возрастных групп.

Животных опытной группы (15 собак) вакцинировали экспериментальной инактивированной вакциной состоящей из антигенов грибов *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* и иммуномодулятора натрия нуклеината. Вакцину вводили внутримышечно, двукратно с интервалом между инъекциями 10 суток, в дозе 1,0 см³ на одно введение. Напряженность и длительность иммунитета у собак проверяли контактным методом заражения. С этой целью иммунизированных животных, в течение 12 месяцев содержали совместно с животными, больными микроспорией и трихофитией. Для чего через каждые 3 месяца подсаживали по 2 собаки, каждую из которых предварительно накожно заражали в 3 участка вирулентными культурами грибов *M. canis* штамм № 62, *M. gypseum* штамм № 510, *T. mentagrophytes* штамм № 2915 (источник инфекции). В качестве контроля заражения использовали клинически здоровых животных, которых также одновременно с больными, подсаживали к иммунизированным собакам. Обследование всех животных, отбор и микологическое исследование патологического материала проводили каждый месяц.

Собаки, привитые инактивированным трехвалентным антигеном в сочетании с нуклеинатом натрия, при совместном содержании с больными животными в течение 12 месяцев, не заболели дерматофитозами. Клинические признаки, как микроспории, так и трихофитии, отсутствовали.

У собак контрольной группы, ранее не подвергавшихся иммунизации и заражению дерматофитозами, при совместном содержании с больными животными, наблюдали проявление клинических признаков заболевания. Из 8 животных, у 7 наблюдали проявление микроспории, обусловленной грибом *M. canis* (результаты микологического исследования патологического материала были положительными) у 2 собак была выделена культура гриба *M. gypseum* и от 6 животных выделена культура гриба *T. mentagrophytes* (микроскопия патологического материала положительная).

Таким образом, полученные данные показали, что методом контактного заражения можно объективно оценивать активность поствакцинального иммунитета против дерматофитозов у животных. При вакцинации собак экспериментальной вакциной в сочетании с иммуномодулятором натрия нуклеинатом в организме животных формировался достаточно напряженный и продолжительный иммунитет против дерматофитозов (не менее 12 месяцев).