

ИФА-НАБОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ

Т. ТУЖИКОВА, начальник ИЛ «Провилаб», **М. ТИТОВА**, ветеринарный врач-иммунолог, ООО «Провими»

В настоящее время усиленное внимание как производителей, так и потребителей комбикормов привлечено к наличию в них микотоксинов. На наш взгляд, эта проблема несколько преувеличена. За два года мониторинга микотоксинов в комбикормах собственного производства, а также других производителей превышение МДУ микотоксинов было лишь в единичных образцах. Несколько иначе дело обстоит с сырьевыми компонентами. По нашим данным, основные источники микотоксинов в комбикорме — загрязненные кукуруза, продукты ее переработки, в редких случаях ячмень. Но при их использовании с другими компонентами общий уровень микотоксинов в конечной продукции не выходит за пределы МДУ. Тем не менее совсем игнорировать данную проблему не стоит, и поэтому нам необходим достоверный метод контроля содержания микотоксинов. А какой же из предлагаемых на диагностическом рынке методов позволяет нам получать точные, достоверные результаты?

В последнее время широкое распространение получил метод иммуоферментного анализа (ИФА). Он не требует дорогостоящего оборудования, достаточно прост в работе и позволяет определять микотоксины одновременно в нескольких объектах. Однако у метода ИФА имеется ряд ограничений, связанных в большей степени с матричным эффектом и перекрестной чувствительностью. Наборы для ИФА валидированы для определенных объектов исследования, в основном для зерновых культур и комбикормов. Это всегда указывается в прилагаемой к набору методике проведения анализа. Для других объектов влияние матрицы на конечный результат либо не изучено, либо оно настолько сильно, что дает артефактный результат (как ложноположительный, так и ложноотрицательный). Поэтому для таких объектов должны применяться другие методы исследования, например ВЭЖХ.

При иммуоферментном анализе почти всегда наблюдается перекрестная чувствительность, то есть идентифицируется не только искомым микотоксин, но и в различной степени его аналоги и метаболиты. Например, при определении Т-2 токсина на конечное его содержание будет оказывать влияние НТ-2 токсин, если он тоже присутствует в образце; зеараленон, как правило, определяется вместе с α - и β -зеараленолом и т.д. К сожалению, в прилагаемых к тест-наборам методиках не всегда приводятся данные о возможном перекрестном определении.

В лабораторию «Провилаб» периодически поступают образцы сырья и комбикормов с результатами других лабораторий. И зачастую они отличаются от наших. Это может быть связано с несоблюдением правил отбора образцов для определения микотоксинов, с неправильным выполнением анализа, что включает в себя пробоподготовку и непосредственно работу с тест-системой. Кроме этого лаборатории, которые занимаются исследованиями

ОТ РЕДАКЦИИ.

Уважаемые читатели! В последних номерах нашего журнала (№6 и №8–2010, №1–2011) были опубликованы статьи, в которых рассмотрены вопросы как нормирования микотоксинов, так и их контроля в комбикормах и сырье для их производства.

Редакция благодарна всем авторам, поделившимся своими наработками и результатами исследований. Однако нам хотелось бы, чтобы в дискуссию на страницах журнала включились лаборатории и других регионов, контролирующие безопасность кормов, а именно занимающиеся определением микотоксинов в комбикормах и сырье для их производства. Для более достоверной оценки ситуации на российском рынке комбикормов было бы важно узнать об их опыте контроля микотоксинов, о проблемах, с которыми они сталкиваются при определении микотоксинов и других показателей безопасности в различных объектах.

Кроме того, мы надеемся получить конструктивный отклик специалистов по применению сорбентов микотоксинов и тест-наборов для их определения, а также узнать, какая информация, по их мнению, должна предоставляться производителям комбикормов, чтобы они могли правильно выбирать сорбенты, а лаборатории — лучше сориентироваться на рынке тест-наборов, чтобы выдавать достоверные результаты и не подводить своих заказчиков — производителей и потребителей комбикормов.

По сути, все мы связаны одной производственной цепочкой — «от поля — до тарелки» и заинтересованы в успешном бизнесе друг друга в России. Так давайте делиться знаниями, опытом и вырабатывать общую позицию, особенно в преддверии вступления в ВТО. Ведь не секрет, что на первых порах нашим сельхозтоваропроизводителям придется несладко из-за сильнейшей конкуренции на европейском и американском рынках.

кормов на микотоксины, используют тест-системы различных производителей, что также может являться причиной расхождения результатов.

В российских лабораториях для определения микотоксинов в кормах применяют следующие тест-наборы для ИФА: Ridascreen (компания R-Biopharm, Германия), Agra Quant (Romer Labs, Австрия), Veratox (Neogen, США), все три набора представляют прямой конкурентный иммуоферментный анализ; Фарматех (Всероссийский НИИ ВСГЭ) — не прямой иммуоферментный анализ. Каждая из фирм при производстве тест-наборов применяет собственные разработки, поэтому их методики проведения анализа отличаются, как и результаты исследований одного и того

же образца. Существенно они отличаются и по затратам времени на анализ. Если в импортных наборах антитела наносят на плашку в заводских условиях, таким образом, готовую к работе, то при использовании отечественных наборов необходимо самостоятельно наносить антиген на плашку и инкубировать ее 16 ч для иммобилизации антигена, что увеличивает время на анализ и ухудшает воспроизводимость результатов.

На протяжении последних двух лет в нашей лаборатории во время рутинной работы был выявлен ряд закономерностей, позволяющих развернуто оценивать результаты, полученные с использованием различных тест-систем. Для объективной оценки их эффективности мы закупили диагностикумы основных производителей, представленных на российском рынке. В качестве контроля были выбраны сертифицированные референс-образцы (с заданным содержанием различных микотоксинов) компаний R-Biopharm и Romer Labs. Пробы представляют собой естественно загрязненное зерно (сорго, пшеница, кукуруза) с содержанием либо одного микотоксина (зеараленон, ДОН, охратоксин, фумонизин) — моностандарты, либо нескольких (Т-2 и НТ-2 токсины, афлатоксин, фумонизин, зеараленон) — мультистандарт. Последний был для нас особенно интересен, потому что позволял оценить возможный эффект именно от их сочетанного действия (ожидаемые концентрации указаны в таблицах по каждому конкретному токсину). Для эксперимента мы использовали наборы только для количественного определения токсинов с высокой степенью чувствительности и с запасом срока годности. Хотим отметить, что цель этой работы заключалась исключительно в получении достоверных и воспроизводимых результатов.

При контроле *Т-2* токсина мы использовали мультистандартный образец, содержащий Т-2 и НТ-2 токсины. Поскольку эти токсины схожи по своей структуре (НТ-2 является метаболитом Т-2), то при их определении может наблюдаться перекрестный эффект. Об этом, как правило, производители наборов предупреждают в своих методиках. Так, в наборах Ridascreen указывается, что при 100%-ном извлечении Т-2 токсина перекрестная чувствительность с ацетил-Т-2 токсином составляет 114%, с НТ-2 токсином — 7%, изо-Т-2 токсином — 2%. Наборы Agra Quant дают перекрестную чувствительность с НТ-2 токсином в количестве 44%, Т-2 триол — 1,6%; наборы Veratoh указывают на 100%-ное извлечение Т-2 и НТ-2 токсинов; Фарматех — ацетил-Т-2 токсин — 24%, НТ-2 токсин — 3%.

В нашем случае мультистандартный образец содержал и другие микотоксины: афлатоксины — В1 — 0,013 мг/кг, В2 — 0,0006, G1 — 0,0016; ДОН — 0,0022; НТ-2 токсин — 0,51; Т-2 токсин — 0,3; фумонизины — В1 — 0,0199, В2 — 0,0063, В3 — 0,0015; зеараленон — 0,265 мг/кг.

Этот же мультистандартный образец применялся и при работе с наборами по определению других микотоксинов.

В таблице 1 — результаты определения содержания Т-2 токсина при использовании различных тест-наборов.

Таблица 1. Результаты по Т-2 токсину, мг/кг

Контрольный образец и ожидаемое содержание в нем микотоксина	Тест-набор			
	Ridascreen	Agra Quant	Veratoh	Фарматех
Т-2 токсин, 0,243-0,357 мг/кг НТ-2 токсин, 0,427-0,593 мг/кг	0,478	0,576	1,674	от 0,039 до 0,925

Наборы Ridascreen и Agra Quant показали завышенное содержание Т-2 токсина против максимально ожидаемого

в соответствии с указанной перекрестной чувствительностью с НТ-2 токсином. Существенное превышение ожидаемого значения отмечалось при работе с наборами Veratoh, рассчитанными на 100%-ную индикацию и идентификацию микотоксинов Т-2 и НТ-2. По наборам Фарматех приведен диапазон данных по Т-2 токсину, так как при разном разведении экстракта образца были получены различные результаты. Причем определяли токсин одновременно на одной планшете по одному калибровочному графику, построение которого также было затруднительно, потому что зависимость оптической плотности реакционной смеси в лунке от концентрации микотоксина практически не наблюдается. Следует отметить, что для всех наборов существует определенный диапазон измеряемых концентраций с указанием предела обнаружения. Данные по наборам для Т-2 токсина приведены в таблице 2.

Таблица 2. Данные производителей тест-наборов для Т-2 токсина

Характеристика	Тест-набор			
	Ridascreen	Agra Quant	Veratoh	Фарматех
Валидированная матрица	Зерновые культуры и комбикорма	Зерновые культуры и корма	Кукуруза, ячмень, овес, рис, соя, пшеница	Кормовое сырье растительного происхождения, комбикорма
Предел обнаружения, мг/кг	0,005	0,035	0,025	не указан
Диапазон измеряемых концентраций, мг/кг	0,0035–0,056	0,075–0,5	0,025–0,25	0,02–0,5

Предел обнаружения указывает на минимальное количество вещества, которое возможно определить данным методом на данном оборудовании. Значения ниже этого предела считаются недостоверными, как и выше конечного диапазона измеряемых концентраций, так как выходят за пределы калибровочного графика. В случае высокого содержания микотоксина проблема решается достаточно просто — разведением экстракта до необходимой концентрации, что и было нами сделано.

Наиболее чувствительны к достаточно низким концентрациям микотоксина наборы Ridascreen, тогда как наборы Agra Quant позволяют работать без разведения получаемого экстракта при контаминации образца микотоксином на уровне МДУ. При этом особое внимание необходимо обращать на валидированную матрицу, для всех наборов — это зерновые культуры и корма. Только для них результаты можно считать достоверными.

Зеараленон — один из наиболее критичных микотоксинов. До недавнего времени его содержание в комбикормах для поросят и супоросных свиноматок не допускалось, а сейчас строго регламентировано и составляет 0,035 мг/кг.

Перекрестная чувствительность по наборам Ridascreen составляет: α -зеараленон — 41,6%, β -зеараленон — 13,8, зеранол — 27,7%. По остальным наборам информации нет. В нашем эксперименте при работе с наборами для определения зеараленона использовались три стандартных образца — два моностандарты (сорго и кукурузы) с разным содержанием микотоксина и мультистандарт. Данные по этому микотоксину представлены в таблице 3.

Наиболее воспроизводимые результаты получены на наборах Ridascreen и Veratoh, на наборах марки Agra Quant — они чуть выше верхней заданной границы содержания. Умеренное завышение результатов по сравнению

Таблица 3. Результаты по зеараленону, мг/кг

Контрольный образец и ожидаемое содержание в нем микотоксинов	Тест-набор			
	Ridascreen	Agra Quant	Vera-tox	Фарматех
Мультистандарт, 0,229–0,301 мг/кг	не исследовался	0,312	0,244	от 0,3 до 0,5
Моностандарт, 0,508–0,788 мг/кг	0,601	0,852	0,591	1,463
Моностандарт, 0,051–0,069 мг/кг	0,053	0,074	не исследовался	не исследовался

Таблица 4. Данные производителей тест-наборов для зеараленона

Характеристика	Тест-набор			
	Ridascreen	Agra Quant	Vera-tox	Фарматех
Валидируемая матрица	Зерновые культуры, комбикорма	Зерно, корма	Кукуруза, ячмень, овес, пшеница, корма	Кормовое сырье растительного происхождения, комбикорма
Предел обнаружения, мг/кг	0,00175	0,01	0,01	не указан
Диапазон измеряемых концентраций, мг/кг	0,00175–0,14175	0,04–1	0,025–0,5	0,02–0,5

Таблица 5. Результаты по охратоксину А, мг/кг

Контрольный образец и ожидаемое содержание в нем микотоксинов	Тест-набор			
	Ridascreen	Agra Quant	Vera-tox	Фарматех
Моностандарт, 0,0039–0,0059 мг/кг	0,0053	0,004	не исследовался	не обнаружен
Моностандарт, 0,0017–0,0037 мг/кг	не исследовался	0,0023	0,0037	от 0,0045 до 0,0095

Таблица 6. Данные производителей тест-наборов для охратоксина А

Характеристика	Тест-набор			
	Ridascreen	Agra Quant	Vera-tox	Фарматех
Валидируемая матрица	Зерновые культуры, комбикорма	Кукуруза, ячмень, соя, пшеница, корма	Зерно, зернопродукты	Кормовое сырье растительного происхождения, комбикорма
Предел обнаружения, мг/кг	0,0025	0,0019	0,001	не указан
Диапазон измеряемых концентраций, мг/кг	0,00125–0,045	0,002–0,04	0,002–0,025	0,02–0,5

с наборами Ridascreen мы отмечаем и в рутинной работе с образцами.

При работе с наборами Фарматех отмечалась хорошая воспроизводимость построения калибровочных графиков, низкий коэффициент вариации по сравнению с наборами на Т-2 токсин, однако результаты преимущественно превышали верхнюю границу ожидаемого содержания.

Данные производителей тест-наборов по валидируемой матрице, диапазону и пределу обнаружения зеараленона представлены в таблице 4.

Охратоксин А определяли в двух моностандартах — в образцах измельченной пшеницы с разным содержанием

Таблица 7. Результаты по афлатоксину, мг/кг

Контрольный образец и ожидаемое содержание в нем микотоксинов	Тест-набор			
	Ridascreen	Agra Quant	Vera-tox	Фарматех
Мультистандарт, 0,0098–0,0206 мг/кг	0,016	0,013	0,0073	0,014

микотоксина (табл. 5). Перекрестная чувствительность при определении охратоксина А по наборам Ridascreen составляет: охратоксин С — 44%, охратоксин В — 14%, по остальным наборам информации нет.

Определение охратоксина на наборах всех трех зарубежных производителей не представляет трудности; результаты хорошо воспроизводятся. При использовании наборов Фарматех работа осложняется, прежде всего, из-за низкой чувствительности тест-системы — 0,02 мг/кг, тогда как МДУ охратоксина в комбикормах составляет 0,01 мг/кг. Поэтому при его определении в контрольном образце нам пришлось последний концентрировать в 2 раза, а также дополнительно готовить еще один стандарт с концентрацией 0,004 мг/кг, что не предусмотрено методикой и увеличивает погрешность определения микотоксина.

Данные по валидируемой матрице, диапазону и пределу обнаружения охратоксина А представлены в таблице 6.

Определение содержания афлатоксина не представляет больших трудностей. Несмотря на достаточно низкий максимальный допустимый уровень афлатоксина в комбикормах (0,01 мг/кг), в нашей практике не встречалось ни одного образца корма с высоким уровнем этого токсина, а со слабым уровнем контаминации — буквально единицы.

Определяемые значения по афлатоксину не только воспроизводимы на разных тест-системах, но и имеют достаточно хорошую сходимость между собой. Исключение составляют тест-системы Veratox: результаты нескольких измерений немного ниже ожидаемых. Возможно, это обусловлено высокой скоростью протекания иммунологической реакции (2–3 мин) и соответственно неравномерной скоростью связывания антител в лунках.

Данные по валидируемой матрице, диапазону и пределу обнаружения афлатоксина представлены в таблице 8.

Таблица 8. Данные производителей тест-наборов для афлатоксина

Характеристики	Тест-набор			
	Ridascreen	Agra Quant	Vera-tox	Фарматех
Валидируемая матрица	Зерновые культуры, корма	Зерно, корма	Зерно, зернопродукты, корма	Кормовое сырье растительного происхождения, комбикорма
Предел обнаружения, мг/кг	0,00175	0,003	0,0014	не указан
Диапазон измеряемых концентраций, мг/кг	0,00175–0,14175	0,004–0,04	0,005–0,05	0,002–0,05

Для определения фумонизина были использованы два стандарта — мультистандарт, контаминированный также другими микотоксинами, и моностандарт. Перекрестная чувствительность по набору Ridascreen составляет: фумонизин В1 — 100%, фумонизин В2 — 40%, фумонизин В3 — 100%. В наборе Фарматех указана индикация фумонизина В1, по остальным наборам информации не имеется. Наборы использовались для определения общего фумонизина. При работе с мультистандартом результаты

по всем тест-системам несколько превышали суммарное содержание фумонизинов. При работе с образцом, контаминированном только фумонизином, такая тенденция отсутствует (табл. 9).

При работе с наборами Фарматех не удалось подобрать необходимого разведения экстракта, которое позволило бы определить концентрацию микотоксина в мультистандарте. В моностандарте, содержащем фумонизин в пределах диапазона измерения, результат вышел за пределы графика так же, как и при последующем разведении экстракта. И хотя точного содержания фумонизина в стандартных образцах получить не удалось, результаты позволяют судить о существенном превышении верхней границы обнаружения микотоксина.

Данные по валидированной матрице и диапазону измерений фумонизина приведены в таблице 10.

Для определения содержания дезоксиниваленола (ДОН) применялись также мультистандарт и моностандарт (образец измельченной пшеницы). Перекрестная чувствительность по наборам Ridascreen составляет: 3-ацетилдезоксиниваленол — 15%, ацетилдезоксиниваленол — 19%, ниваленол — 4%, фузаренон и Т-2 токсин — менее 1%. В наборах Фарматех указано, что измерение содержания микотоксинов проводится в эквивалентах 4-дезоксиниваленола, в остальных наборах информация по перекрестной чувствительности отсутствует.

Дезоксиниваленол относится к микотоксинам, экстрагируемым водой, хотя в наборах Фарматех используется ацетонитрильный экстракт, единый для всех наборов этого производителя. Пробоподготовка для работы на наборах зарубежных производителей идентична и отличается только временем инкубации: для наборов Ridascreen — 3 мин, Veratox — 5 мин, Agra Quant — 30 мин. Из данных таблицы 11 видно, что в моностандарте эти наборы обнаруживают одинаковое содержание микотоксина. В мультистандарте результат, полученный с помощью набора Agra Quant, проходит по верхней границе обнаружения. Работая с наборами Фарматех, мы наблюдали ситуацию, подобную при работе с другими наборами этого производителя: чем больше разведение, тем выше содержание микотоксина.

Данные по валидированной матрице, диапазону и пределу обнаружения ДОН представлены в таблице 12.

Результаты проведенной нами работы позволяют сделать следующие выводы:

- наименьшее количество замечаний вызвали у нас наборы Ridascreen. Наборы Agra Quant показали немного завышенный результат по зеараленону, а Veratox — по Т-2 токсину и заниженный по афлатоксину. На наборах Фарматех единственный достоверный результат был получен по афлатоксину, при определении остальных микотоксинов результаты были либо некорректными, либо плохо воспроизводимыми;

- все примененные в нашей работе наборы имеют перекрестную чувствительность, даже если об этом нет информации в методике выполнения измерений. Особенно это было заметно в работе с наборами по определению фумонизина в мультистандарте, контаминированном несколькими микотоксинами;

- при работе с наборами по определению микотоксинов нужно обращать внимание на валидированную матрицу. Из данных таблиц 2, 4, 6, 8, 10 и 12 видно, что для всех наборов — это зерновые культуры и корма. Определять микотоксины в БВМК, премиксах, дрожжах кормовых и других объектах на этих наборах недопустимо из-за того, что не изучено влияние матрицы на конечный результат;

Таблица 9. Результаты по фумонизину, мг/кг

Контрольный образец и ожидаемое содержание в нем микотоксина	Тест-набор			
	Ridascreen	Agra Quant	Veratox	Фарматех
Мультистандарт: фумонизин В1 — 18,3–21,5 мг/кг, фумонизин В2 — 5,5–7,1, фумонизин В3 — 1,3–1,7 мг/кг или суммарное со- держание — 25,1–30,3 мг/кг	36,3	39,1	31	более 100 мг/кг
Моностандарт: фумонизин В1 — 1,78–3,04 мг/кг, фумонизин В2 — 0,51–0,75 мг/кг или суммарное содержание — 2,29–3,79 мг/кг	2,87	3,07	2,7	более 25 мг/кг

Таблица 10. Данные производителей тест-наборов для фумонизина

Характеристика	Тест-набор			
	Ridascreen	Agra Quant	Veratox	Фарматех
Валидированная матрица	Кукуруза, пищевые продукты на основе кукурузы	Зерновые культуры, корма	Зерно, зернопродукты	Кормовое сырье растительного происхождения, комбикорма
Предел обнаружения, мг/кг	0,025	0,2	0,2	не указан
Диапазон измеряемых концентраций, мг/кг	0,025–2	0,25–5	1–6	0,2–5

Таблица 11. Результаты по дезоксиниваленону, мг/кг

Контрольный образец и ожидаемое содержание в нем микотоксина	Тест-набор			
	Ridascreen	Agra Quant	Veratox	Фарматех
Мультистандарт, 1,6–2,8 мг/кг	1,6	2,64	1,83	от 0,55 до более 5
Моностандарт, 0,7–0,9 мг/кг	0,9	0,9	0,83	от 0,51 до 3,24

Таблица 12. Данные производителей тест-наборов для дезоксиниваленола

Характеристика	Тест-набор			
	Ridascreen	Agra Quant	Veratox	Фарматех
Валидированная матрица	Зерновые культуры, корма, солод	Зерно, корма	Зерно, зернопродукты	Кормовое сырье растительного происхождения, комбикорма
Предел обнаружения, мг/кг	0,0185	0,2	0,1	не указан
Диапазон измеряемых концентраций, мг/кг	0,0185–0,5	0,25–5	0,25–2	0,02–0,5

- при работе с образцами с уровнем контаминации ниже предела обнаружения или выше верхней границы диапазона измеряемых концентраций также могут быть получены некорректные результаты. В этом случае необходимо правильно подобрать набор или подготовить должное разведение экстракта.