

О ГОСТ 31674-2012 «КОРМА, КОМБИКОРМА, КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ»

А. ГРОЗДОВ, канд. биол. наук, ООО «АВИСАР»

К этой теме автор возвращается второй раз. Первый раз в трех статьях под общим названием «О новом стандарте по определению общей токсичности», опубликованных в 2006 г. в номерах 3, 4 и 6, был дан анализ введенного в действие ГОСТ Р 52337-2005 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности». К сожалению, ни одно из замечаний автора, указанных в статьях, не было учтено при создании последующих ГОСТ. Это послужило поводом вновь обратиться к данной теме.

Действующий Межгосударственный стандарт ГОСТ 31674-2012 с Изменением №1 от 2017 г. «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности» включает экспресс-методы на инфузориях и основные методы. Начнем с основных, или арбитражных, методов, основанных на использовании высших теплокровных животных — мышей и кроликов. Они являются подтверждающими и окончательными и предусматривают комплексные исследования кожной биопробы на кроликах и биопробы на мышах, что позволяют в течение 3–5 суток дать окончательное заключение о токсичности корма. Результат определяют по совокупности реакций в обоих методах: корм нетоксичный (нетоксичен в обоих тестах) и корм токсичный (токсичен хотя бы в одном тесте). Здесь следует сразу отметить, что Комитетом по биоэтике Совета Европы, членом которой Российская Федерация является с 1996 г., биоанализ на высших животных запрещен с 1998 г.

Рассмотрим подробно каждый арбитражный метод.

1. Определение общей токсичности кормов биопробой на кролике (кожная проба). Кожная проба кролика — одна из разновидностей теста Драйза (Draize и соавт., 1944), который широко использовался во второй половине прошлого века для оценки повреждающего и раздражающего действия различных препаратов на глаза и кожные покровы лабораторных животных. В России тест Драйза был адаптирован во ВНИИВС в 1944 г. для определения на кролике токсичности кормов, фуражного зерна и продуктов его переработки и известен как кожная проба. Это один из самых болезненных тестов для животных, поэтому он был запрещен в 1998 г., как уже упоминалось выше.

Воспалительную реакцию кожи кролика вызывают не все токсины, а только микотоксины дермoneкротического действия. А, например, охратоксины, крайне опасные для птицеводства и свиноводства, не вызывают воспалитель-

ную реакцию. Кроме того, эпидермальные клетки кожи склонны к аллергическим реакциям. Вследствие этого входящие в состав современных комбикормов различные премиксы, консерванты, колоранты и ароматизаторы могут вызвать обыкновенную кожную экзему, не связанную с токсичностью комбикормов. Об этом недостатке кожной пробы кролика знали еще 35 лет назад, поэтому в ГОСТ 13496.7-87 ГОСТ 13496.7-92 «Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения токсичности» этот метод был оставлен только для тестирования зерна и продуктов его переработки, а токсичность комбикормов определялась на белых мышах по воспалительной реакции ткани при подкожном введении ацетоновых экстрактов комбикормов.

Разработанный во ВНИИ комбикормовой промышленности в 1986 г. метод с пробами на белых мышах является классическим примером моделирования комбикормов с микотоксинами. Построенная модель полнофакторного эксперимента с четырьмя микотоксинами с научной точки зрения была безукоризненной, поэтому указанный метод был включен в ГОСТ без производственной проверки. Однако модель не повторяется на практике, так как сочетание различных видов токсинов в комбикормах великое множество. Практическое использование этого метода в хозяйствах полностью показало его несостоятельность, в результате чего с 1993 г. его отменили. Арбитражным методом при определении токсичности комбикормов, несмотря на указанный выше недостаток, вновь стала кожная проба на кролике.

2. Определение общей токсичности на мышах. Этот метод был утвержден 28.12.1979 г. Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР (ГУВ МСХ СССР) и предназначен для определения токсичности шротов, жмыхов и кормовых дрожжей. Основан он на извлечении токсических веществ ацетоном и введении

концентрированного экстракта однократно в желудок пяти белым мышам. В дальнейшем метод стал широко применяться в токсикобиологических исследованиях для определения токсичности комбикормов и его компонентов. При этом не учитывалось, что качественный и количественный состав токсических веществ в шротах, жмыхах и кормовых дрожжах может существенно различаться с присутствующими в комбикормах токсинами. Среди лабораторных животных мыши отличаются наибольшей токсикорезистентностью, то есть малой чувствительностью к афлатоксину В1 и охратоксину А. В то же время наиболее чувствительными к охратоксину являются птица и свиньи.

В то время не было утверждающих и разрешающих документов ГУВ МСХ СССР на использование метода на мышах для определения токсичности комбикормов. В 1986 г. в системе Министерства хлебопродуктов СССР были разработаны рекомендации, но опять же по контролю качества импортного сырья для производства комбикормов, в которых указывалось, что более объективное токсикологическое состояние выявляется с помощью теста на белых мышах. При этом важно помнить, что тест на белых мышах требует очень осторожного исполнения. При незначительном повреждении пищевода во время введения экстракта тупой иглой можно получить неадекватную токсичности реакцию в опыте и даже отход в контроле при введении растительного масла.

Теперь подойдем к основному вопросу: могут ли использоваться метод кожной пробы на кролике и метод на белых мышах в качестве арбитражных для определения токсичности современных комбикормов? Следует отметить, что первому методу в этом году исполнится 77 лет, а второму — 42 года. Современные комбикорма — это продукты нового поколения и их состав существенно отличается от состава комбикормов даже 30-летней давности. Применяемые в действующем ГОСТ арбитражные методы просто не могли учесть произошедших впоследствии качественных изменений в составе кормов. Так, на современных комбикормах цыплята современных кроссов в определенные периоды жизни могут давать приросты до 60–70 г в сутки, в то время как 30 лет назад 23–25-граммовые приросты считались вполне хорошими. Из этого следует, что арбитражные методы — это методы прошлого века. Более современными методами, которые в отличие от арбитражных регистрируют токсическое действие всего комплекса токсинов, являются экспресс-методы на инфузориях. Приведем пример о результатах работы экспресс-методом с использованием инфузорий стилонихий в 1998 г. (с тестированием только ацетоновых экстрактов) на Кинешемской государственной птицефабрике (500 тыс. голов птицы, из них 250 тыс. промышленные несушки и 250 тыс. ремонтный молодняк). Результаты биоанализа, полученные экспресс-методом на инфузориях стилонихиях, в большей степени совпадали с птицеводческими показателями, чем результаты, полученные на кроликах. Совпадение составляло 90%. Анало-

гичные показатели были получены в совхозе «Пермский» (поголовье 160 тыс. свиней) по результатам работы в период с 1990 по 1997 г.

Статус арбитражных методов по сравнению с экспрессными методами предполагает более высокую достоверность результатов тестирования комбикормов, то есть сходимость с объектами сельскохозяйственного выращивания. Как видно из приведенных примеров, они не справляются с этой задачей. Возникает вопрос: нужны ли арбитражные методы на теплокровных животных, достоверность которых ниже экспрессных методов на инфузориях, тем более что Советом Европы такое биотестирование запрещено. Вероятнее всего, нужны арбитражные лаборатории, которые определяли бы при спорных вопросах достоверность результатов, полученных теми же методами в производственно-технологических лабораториях сельскохозяйственных предприятий. Для этого достоверность экспресс-методов должна быть максимальной, но это возможно только при соблюдении определенных условий, которые неполно отражены в действующем ГОСТ. Остановимся на этом подробнее.

Для получения сопоставимых результатов биотестирования одних и тех же проб комбикормов (сырья) в разных лабораториях все условия культивирования инфузорий, подготовки проб и проведения тестирования необходимо унифицировать до мельчайших подробностей в методиках и утвердить в национальных или межгосударственных стандартах. Любое изменение в условиях культивирования от разработанной методики, включая температуру, освещение, кормление, состав среды культивирования, приводит к изменению токсикорезистентности инфузорий (устойчивости к токсическому воздействию) и получению недостоверных результатов тестирования. Недостоверные результаты можно получить и при незначительном нарушении подготовки культуры инфузорий и проб к тестированию, а также проведения тестирования.

Рассмотрим, насколько соответствует указанным требованиям действующий ГОСТ.

Пункт 4.1.2.3. Средой для культивирования инфузорий и разбавления ацетоновых экстрактов кормов служит раствор Лозина-Лозинского, который приведен с двумя ошибками (правильно он был указан Д.О. Виноходовым в ГОСТ 13496.7-97, пункт 7.3.1), а именно: концентрации CaCl_2 и MgCl_2 даны для кристаллогидратов, а не для безводной соли, как должно быть. В результате этого концентрация CaCl_2 в среде культивирования занижена в 1,3 раза, а MgCl_2 — в 2,1 раза. Учитывая, что ионы Са и Mg активно участвуют в движении ионов через плазматическую мембрану, длительное культивирование инфузорий на такой обедненной среде может быть затруднено, может также измениться чувствительность инфузорий к действию токсинов.

Пункт 4.1.2.5. В качестве корма для стилонихий предлагаются хлебопекарные прессованные дрожжи, про-

изведенные в соответствии с ГОСТ 171-81 «Дрожжи хлебопекарные прессованные. Технические условия», которые предварительно высушивают в сушильном шкафу. Снижение качества этих дрожжей на многих заводах-изготовителях является в настоящее время одним из основных факторов, влияющих на вырождение культуры. Корм для стилонихий необходимо унифицировать, а для этого использовать готовые к применению сухие гранулированные пекарские дрожжи без консервантов, какими являются дрожжи хлебопекарные сушеные, выработанные по ГОСТ Р 54845-2011 под торговым названием «Приправыч. Хлебопекарные сушеные дрожжи. Быстродействующие». Изготовителем является АО Компания «Проксима» из Новосибирска. При культивировании в чашку Петри вносят пинцетом, предварительно обработанным этиловым спиртом и подсушенным, две гранулы таких дрожжей.

Пункт 4.1.2.6. В этом пункте условия освещенности не унифицированы. Культивирование инфузорий можно проводить в термостате, то есть в темноте, а также вне термостата, используя для поддержания постоянной температуры лампу дневного света, то есть при постоянном освещении. Инфузории, культивируемые в течение полугода в темноте и на свету, дадут совершенно разные результаты при биотестировании одного и того же образца. Длительное культивирование инфузорий в темноте (около года) приводит к значительному возрастанию их токсикорезистентности, в результате чего они не выявляют даже высокую токсичность корма. Этот «темновой» эффект наблюдался нами на одном из комбикормовых заводов Московской области, в лаборатории которого культивирование инфузорий проводили около года в темноте в суховоздушном термостате при остальных стандартизированных условиях культивирования.

Условия освещенности должны быть унифицированы. Разработчики экспресс-метода на инфузориях стилонихий проводили культивирование с фотопериодизмом (сменой дня и ночи). Это обусловлено тем, что исторически в естественных условиях в активном состоянии инфузории существовали при смене дня и ночи. В лабораторных условиях для создания оптимальной температуры разработчики использовали две лампы дневного света, располагая их на высоте по показанию термометра, находящегося рядом с чашками Петри с культурой инфузорий. На ночь для затемнения чашки Петри со всех сторон прикрывали черной светонепроницаемой фотобумагой (сейчас для этого можно использовать картон), не допуская перегрева культуры (по показанию термометра) и при необходимости включая вентилятор. При культивировании инфузорий в суховоздушном термостате необходимо установить в нем маломощную лампу дневного света с реле времени, регулирующим 14 часов — день и 10 часов — ночь.

Пункт 4.1.2.7. В этом пункте сообщается, что для получения достоверных результатов биотестирования один раз в месяц необходимо проверять реакцию культуры на

действие модельного токсиканта (раствора сернокислородной меди в определенной концентрации) в течение 30 мин. Результат при этом считают удовлетворительным, если выживают не менее 50% стилонихий. Возникает вопрос, а если выживает 100% инфузорий, результат также считают удовлетворительным? По данной оценке, ответ положительный. В итоге не удастся выявлять культуру с повышенной устойчивостью к токсическому воздействию (токсикорезистентностью), которая возникает при длительном культивировании инфузорий в «темновых» условиях в термостате. Оценка должна быть корректной и соответствовать токсикологическим нормам, то есть при действии модельного токсиканта результат считают удовлетворительным, если выживают 50% ± 10% стилонихий. При выживаемости ниже 40% культура обладает пониженной токсикорезистентностью, то есть ослаблена по каким-то причинам, а при выживаемости более 60% — повышенной токсикорезистентностью.

Пункт 4.1.2.10. В нем не сказано, как отделяют надосадочную жидкость после центрифугирования водного экстракта. После центрифугирования на дне центрифужной пробирки образуется осадок, а в верхней ее части — слой жира. В связи с этим последнее предложение в пункте необходимо дополнить следующим: «... и отделяют надосадочную жидкость путем фильтрации центрифугата через бумажный фильтр».

Пункт 4.1.3. В этом пункте описывается алгоритм испытания. Оно начинается с посадки инфузорий в микроаквариумы. Согласно действующему ГОСТ автоматической пипеткой отбирают 20 мкл среды со стилонихиями и помещают в каждый из пяти микроаквариумов или лунок предметного стекла. Но автоматической пипеткой невозможно отобрать нужное количество инфузорий, не захватив при этом частички корма (дрожжей). Чаще всего для этого используют калиброванные стеклянные пипетки, внося в каждый микроаквариум по одной капле с инфузориями, так проще и быстрее. В этом случае необходимо соблюдать строго определенный порядок посадки. Инфузории из чашки Петри по одной капле вносят в каждую лунку, вдоль блока луночных микроаквариумов (ряды с пробами расположены поперек), таким образом, чтобы последующая капля попала в лунку следующей по порядку пробы. Необходимость такого внесения инфузорий в лунки связана с образованием в чашке Петри обособленных скоплений с различной токсикорезистентностью инфузорий. Происходит равномерное распределение разночувствительных инфузорий в лунках для каждой пробы и результаты параллельных исследований одной и той же пробы максимально совпадают.

В пятом абзаце пункта сообщается: «Перед каждым внесением раствора экстракта анализируемой пробы в микроаквариум или лунку наконечник пипетки следует вытирать ватой во избежание попадания в них жировых загрязнений с наружной стороны пипетки». Эта операция полностью

зависит от внимательности экспериментатора, то есть она субъективна и требует унифицирования. Указанный абзац необходимо исключить, а пункт 4.1.2.9. (перед таблицей) дополнить предложением: «Полученный водный раствор ацетонового экстракта для избавления от крупнодисперсного жира фильтруют через бумажный фильтр».

Пункт 4.1.4. посвящен обработке результатов. В нем указано, что допускаемое расхождение между результатами двух параллельных определений при доверительной вероятности $P = 0,95$ не должно превышать 1%. Это требование практически невыполнимо, так как культура инфузорий неклональная, а ошибка визуального подсчета инфузорий выше указанной величины.

Достоверность и воспроизводимость экспресс-методов определения общей токсичности кормов с помощью инфузорий является основной задачей ГОСТ, так как корма, отнесенные по результатам биотестирования к нетоксичным, используют по назначению. Из изложенного выше следует, что действующий ГОСТ нуждается в соответствующей доработке.

В соответствии с ГОСТ (с Изменением №1) для экспрессного определения токсичности комбикормов и сырья используются четыре вида инфузорий: стилонихии (*Stylonychia mytilus*), колподы (*Colpoda steinii*), парамеции (*Paramecium caudatum*) и тетрахимена (*Tetrahymena pyriformis*). В принципе, не имеет значения, на каких видах инфузорий проводить биотестирование кормов. При комплексной оценке токсичности, доступной любой лаборатории, выбранные для тестирования инфузории должны быть наименее трудоемки при их культивировании и подготовке к биоанализу, а пробоподготовка и проведение анализа наиболее простыми и быстрыми.

Рассмотрим биотестирование кормов автоматизированным методом на инфузориях парамециях каудатум и тетрахимене пириформис, изложенное в пункте 4.4. ГОСТ 31674-2012 с Изменением №1. Автоматизация метода должна проводиться с целью упрощения и ускорения анализа. В данном случае биотестирование проводится в два этапа. На первом этапе при 2-часовой экспозиции определяют коэффициент выживаемости парамеций, при этом если он не менее 90%, пробу относят к нетоксичной, если менее 50% — к токсичной. При коэффициенте выживаемости парамеций от 90 до 50% испытание проводят на втором этапе с использованием инфузорий тетрахимена пириформис при 20–24-часовой экспозиции. Оценка токсичности определяют по коэффициенту относительного прироста инфузорий в водных экстрактах и в водных растворах ацетоновых экстрактов.

Оценка токсичности по изменению прироста численности инфузорий стилонихий при 24-часовой экспозиции в водном экстракте продукта с наличием его мелкодисперсной взвеси была использована в арбитражном методе по определению токсичности муки кормовой из рыбы еще в 1991 г.

в ГОСТ 29136-91 «Мука кормовая из рыбы, морских млекопитающих, ракообразных и беспозвоночных. Метод определения токсичности». В методе определения токсичности зерна фуражного, продуктов его переработки и комбикормов (ГОСТ 13496.7-92) разработчики перешли на более экспрессную оценку токсичности при 1-часовой экспозиции инфузорий стилонихий в водных растворах ацетоновых экстрактов, так как производителям и потребителям комбикормов требовался экспрессный часовой метод.

Прошло 24 года с момента введения в действие ГОСТ 13496.7-92 и с 2017 г. Изменения №1 в ГОСТ 31674-2012 с включением автоматизированного метода на инфузориях, который кроме усложнения и увеличения времени биоанализа ничего нового не дал. Чтобы доказать это, достаточно обратиться к отзывам об использовании экспресс-метода на инфузориях стилонихиях. В отзыве совхоза «Пермский» от 19.03.1997 г. №0001/3-186 сообщается, что слаботоксичные корма, выявленные методом на инфузориях стилонихиях (выживаемость инфузорий ниже 90%), подтверждают токсичность на свиноголовье: при скармливании этих партий кормов свиноматкам и поросятам у них снижается поедаемость, возникают рвота и гастроэнтериты. При потреблении таких кормов в течение недели и свыше начинается массовый падеж поросят и аборт у свиноматок. Данный экспресс-метод позволяет в течение 1,5–2 часов определить токсичность комбикормов и принять меры по предупреждению скармливания слаботоксичных кормов свиноголовью. Совпадение результатов по токсичности кормов, полученных на инфузориях стилонихиях, с клинической картиной на поросятах и свиноматках, достигает 90%.

В мае 1998 г. в отзыве Кинешемской птицефабрики также сообщается: слаботоксичные корма, выявленные на инфузориях стилонихиях, подтверждают токсичность на птице: наблюдаются расстройства со стороны желудочно-кишечного тракта — энтериты, перитониты, а также снижение яичной продуктивности. Совпадение результатов по токсичности комбикормов, полученных на инфузориях стилонихиях, с клинической картиной на курах и ремонтном молодняке, составляет 90%. Экспресс-метод определения токсичности комбикормов на инфузориях стилонихиях наиболее приемлем для птицеводческих предприятий и комбикормовых заводов.

Использование экспресс-методов при комплексном определении токсичности комбикормов ограничено двумя случаями: тестированием ацетонового экстракта стартерных (престартерных) комбикормов для поросят и телят, содержащих ароматизаторы, и тестированием водных экстрактов комбикормов для свиней, содержащих подкислители (органические кислоты). И в одном и в другом случае методы дают псевдотоксический эффект.

Этот недостаток можно ликвидировать на свинокомплексах — в их производственных лабораториях работают с инфузориями. Для этого на свежих стартерных

кормах с ароматизатором, определенных по свиноводческим показателям как нетоксичные (хорошего качества), необходимо отработать контрольную дозировку, то есть максимальную, при которой еще не происходит гибели инфузорий (ЛКО). Этого можно достичь путем снижения дозировки ацетонового экстракта в водной среде, уменьшая объем отобранного экстракта и увеличивая объем водной среды. Найденная концентрация ацетонового экстракта в водной среде будет рабочей для данного вида комбикорма.

Проблема псевдотоксического эффекта при тестировании водных экстрактов комбикормов для свиней, содержащих подкислители (органические кислоты), была решена в 2017 г. с внесением Изменения № 1 в ГОСТ 31674-2012: время экспозиции инфузорий в водном экстракте с 3 часов было изменено на 1 час (пункт 4.1.3.). При 3-часовой экспозиции наличие органических кислот в комбикормах вызывало гибель инфузорий в интервале 1,5–2 часа. Однако биотестирование кормов автоматизированным методом на инфузориях при более длительной экспозиции (пункт 4.4.) может показать их токсичность.

В заключение необходимо остановиться на перспективах развития токсикологических исследований комбикормов и комбикормового сырья. В 1998 г. в лаборатории прикладной физиологии и токсикологии ВНИРО автор данной статьи участвовал в апробации автоматизированного метода определения токсичности по ингибированию аце-

тилхолинэстеразы, разработанного одним из российских университетов. Данный фермент осаждался на мембранный фильтр и при воздействии раствора, содержащего токсины, происходило его ингибирование, которое через систему датчиков регистрировалось на цифровом дисплее. Проводилось испытание водных растворов ацетоновых экстрактов комбикормов, определенных на инфузориях стилонихиях как нетоксичные, слаботоксичные и токсичные. Ингибирование ацетилхолинэстеразы, отображенное на цифровом дисплее в процентах, соответствовало проценту выживаемости инфузорий стилонихий. Продолжительность определения составляла две минуты. В медицинской токсикологии воздействие токсических веществ на организм человека давно выявляется по ингибированию ацетилхолинэстеразы. Объекты сельскохозяйственного выращивания, так же как организм человека, содержат фермент ацетилхолинэстеразу.

В статье прослеживается историческое развитие токсикологии комбикормов, которое начиналось в 1944 г. на теплокровном организме — кролике, в 1992 г. продолжилось на одноклеточном организме — инфузории, а в дальнейшей перспективе должно происходить на ферментном уровне по ингибированию ацетилхолинэстеразы. Регуляторам отрасли необходимо ориентироваться на развитие этого уровня, требующего проведения научно-исследовательских работ и финансовой поддержки. За ним будущее. ■



ИНФОРМАЦИЯ

В России за июнь этого года зафиксировано 33 случая бешенства крупного рогатого скота (КРС). Для сравнения: в мае таких случаев было 11. Всего в июне выявлено 139 животных, инфицированных бешенством. Такие данные «Ветеринарии и жизни» сообщили в Центральной научно-методической ветеринарной лаборатории Россельхознадзора (ФГБУ «ЦНМВЛ»). Среди других сельскохозяйственных животных бешенство диагностировано у свиней — 30 случаев, по одному факту отмечено у лошадей и мелкого рогатого скота. Помимо этого, в июне выявлено 25 зараженных бешенством собак и 21 кошка. Также зафиксировано 18 случаев этой инфекции у лис, шесть — у енотовидных собак, по одному — у волков, лосей, хомяков и мышей.

«Наибольшее количество случаев выявлено в Красноярском крае, Сара-

товской, Волгоградской, Пензенской и Воронежской областях, а также в Республике Татарстан», — добавили в ЦНМВЛ. Эксперты отметили, что в регионах с наибольшей выявляемостью вируса у животных проводится активная лабораторная диагностика.

Ветеринарные специалисты напоминают, что основной метод профилактики бешенства у животных — вакцинация. Диких зверей иммунизируют с помощью оральных вакцин, их разбрасывают в местах обитания плотоядных в виде приманок. Домашних и сельскохозяйственных животных вакцинируют подкожно или внутримышечно. Домашних питомцев — кошек и собак — ветеринарные врачи рекомендуют прививать от бешенства не реже одного раза в год. Животные-компаньоны могут заразиться инфекцией от диких зверей, а затем инфицировать своего владельца. Так было

в Волгоградской области, где 60-летняя женщина заразилась бешенством от своей домашней кошки. Позже пенсионерка скончалась в больнице.

Справка «ВиЖ»

Бешенство — острое инфекционное заболевание нервной системы, которое приводит к летальному исходу. Вирус передается со слюной от больных животных при укусе или попадании на поврежденные участки кожи. Распознать заболевание у питомца позволит необычное поведение. Это может быть беспричинное беспокойство, повышенная чувствительность к свету и шуму, агрессия. Инфекция вызывает судороги, слюнотечение, нарушение координации движений, паралич. Дикие животные не проявляют страха перед человеком.

vetandlife.ru / vizh / sobytiya / v-rossii-