ORIGINAL ARTICLE

Contamination Rate of Eggs with Mycotoxins in Mazandaran Province, Iran 2019

Majid Saeedi[1],
Mohammad Reza Shiran[2],
Esmaeil Babanezhad[3],
Haniyeh Pazoki[4],
Sahar Abaskhani-Davanlo[4],
Fatemeh Khaleghi[5]

[1] Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Associate Professor, The Health of Plant and Livestock Products Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, The Health of Plant and Livestock Products Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] MSc in Chemistry, The Health of Plant and Livestock Products Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] PhD in Natural Products, The Health of Plant and Livestock Products Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received December 24, 2019 ; Accepted May 13, 2020)

Abstract

Background and purpose: Contamination of food with mycotoxins is among the major threats to food security, and human and animal health that cause significant economic losses in countries. This contamination is found in poultry and animal products and can pose risks to human health. Despite the mass production and consumption of egg, this product has not been well evaluated for the presence of mycotoxins. According to previous studies, there is high possibility of fungal infections and consequently production of mycotoxins in poultry feed. Here, we aimed to perform a quality control study on the safety of this product in Mazandaran province market by developing current techniques.

Materials and methods: In this experimental study, 45 egg samples were collected from three cities in summer 2019, during two phases. Aflatoxin and ochratoxin were extracted using appropriate solvents. In the ELISA method, the extracted samples were directly analyzed while being purified by immunoaffinity column for HPLC measurement.

Results: Among the samples examined, aflatoxin G_2 (0.010 to 4.726 µg/Kg) was found in 36 cases. These values are lower than maximum residue limit allowed for foods. Ochratoxin was not detected in any sample.

Conclusion: According to current study, there were low levels of aflatoxin in the eggs and they can be considered as a safe food in terms of aflatoxin contamination.

Keywords: aflatoxin, ochratoxin, ELISA, HPLC, egg

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30(186): 58-67 (Persian).

* **Corresponding Author: Fatemeh Khaleghi -** The Health of Plant and Livestock Products Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: ftkhaleghi@yahoo.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-04]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی ام شماره 186 تیر سال 1399 (67-58)

بررسی میزان آلودگی تخم مرغ های موجود در استان مازندران به مایکوتوکسین ها در سال 1398

مجید سعیدی[1]
محمدرضا شیران[2]
اسماعیل بابانژاد[3]
هانیه پازوکی[4]
سحر عباسخانی دوانلو[4]
فاطمه خالقی[5]

چکیده

سابقه و هدف: آلودگی به مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی یک تهدید عمده برای سلامتی انسان و حیوانات است که باعث خسارات اقتصادی قابل توجهی می‌شود. از آن‌جا که این آلودگی در بدن طیور و حیوانات یافت می‌شود، می‌تواند خطراتی را به سلامتی انسان وارد نماید. با وجود تولید و مصرف انبوه تخم‌مرغ، این محصول از نظر وجود مایکوتوکسین‌ها آنچنان که باید مورد بررسی قرار نگرفته است. طبق مطالعات پیشین، امکان آلودگی‌های قارچی و در نتیجه تولید مایکوتوکسین‌ها درغذای طیور بسیار بالاست. مطالعه حاضر امیدوار است بتواند با توسعه تکنیک‌های موجود، یک مطالعه کنترل کیفی در مورد وضعیت ایمنی این محصول در بازار مازندران نشان دهد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی،تعداد 45 نمونه تخم‌مرغ از سه شهر در استان مازندران در تابستان سال 1398 طی دو مرحله جمع‌آوری و آفلاتوکسین و اکراتوکسین موجود در آن‌ها با استفاده از حلال‌های مناسب استخراج شد. سپس در روش الایزا نمونه‌های استخراج شده به‌طور مستقیم و برای اندازه‌گیری به روش HPLC ابتدا با ستون ایمیونوافینیتی خالص‌سازی انجام گرفت و سپس مورد آنالیز قرار گرفتند.

یافته‌ها: از میان نمونه‌های بررسی شده، در 36 مورد، آفلاتوکسین G_2 با مقدار حداقل 0/010 تا حداکثر 4/726 µg/Kg شناسایی شد که این مقادیر، از حد مجاز در نظر گرفته شده برای مواد غذایی کم‌تر می‌باشند. در هیچ‌کدام از نمونه‌ها، اکراتوکسین مشاهده نشد.

استنتاج: بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، میزان آفلاتوکسین موجود در تخم‌مرغ ناچیز بوده و به نظر می‌رسد بتوان تخم‌مرغ را به عنوان یک غذای ایمن از دیدگاه آلودگی به آفلاتوکسین، در نظر گرفت.

واژه های کلیدی: آفلاتوکسین، اکراتوکسین، الایزا، HPLC، تخم مرغ

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که توسط برخی از گونه‌های قارچی نظیر آسپرژیلوس و پنی‌سلیوم تولید می‌شوند که ممکن است مخاطراتی را به همراه داشته و سلامتی انسان‌ها و ایمنی مواد غذایی را تحت تاثیر قرار دهند. به دلیل فراگیر بودن توزیع قارچ‌ها در سراسر جهان، آن‌ها به‌عنوان آلاینده‌های اجتناب ناپذیر

مولف مسئول: فاطمه خالقی - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران - مرکز تحقیقات سلامت فرآورده های گیاهی و دامی E-mail: ftkhaleghi@yahoo.com
1. استاد، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه عاوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
2. دانشیار، مرکز تحقیقات سلامت فرآورده های گیاهی و دامی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
3. استادیار، مرکز تحقیقات سلامت فرآورده های گیاهی و دامی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
4. فوق لیسانس شیمی، مرکز تحقیقات سلامت فرآورده های گیاهی و دامی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
5. Ph.D شیمی ترکیبات طبیعی، مرکز تحقیقات سلامت فرآورده های گیاهی و دامی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : 1398/10/30 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 1398/11/2 تاریخ تصویب : 1399/2/24

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-04]

مـواد غـذایی و خـوراک دام و طیـور در نظـر گرفتـه می‌شوند. در میان مایکوتوکسین ها، شـش گـروه شـامل آفلاتوکســـین‌هـــا (AFs)، اکراتوکســـین A (OTA)، فومونیسـین‌هـا، داکسـی نیوالنـول (DON)، پـاتولین و تریکوتسن‌ها شـایع‌تـرین سـموم قـارچی هسـتند کـه در خوراک حیوانات و غذای انسان وجود دارند(1).

آفلاتوکســـین (Aflatoxin) واژه کوتـــاه شـــده toxin *Aspergillus flavus* بـه معنـی سـم یکـی از گونه‌هـای قـارچی مولـد آن مـی‌باشـد. بـیش از 20 نـوع آفلاتوکسین مختلف شناسایی شده است که فقـط انـواع B_1، B_2، G_1 و G_2 به طور طبیعی تولید مـی‌شـوند و سـایر آفلاتوکسین‌ها ماننـد M_1، M_2، P_1، Q_1، آفلاتوکسـیکول و سایر موارد، تولیدات متابولیکی میکروبـی یـا حیـوانی هسـتند. آفلاتوکسـین‌هـای M_1 و M_2 متابولیـت‌هـای هیدروکسیله B_1 و B_2 هستند. آفلاتوکسین B_1 عمده‌ترین آفلاتوکسـینی اسـت کـه تولیـد مـی‌شـود و سـمی‌تـرین ترکیب این گروه نیز می‌باشد، که بـه عنـوان ترکیبـی بـا سمیت زیاد (LD_{50} 50-1 میکروگرم بر کیلوگرم) بـرای بیش‌تر گونه‌های طیور در نظـر گرفتـه مـی‌شـود. سـمیت آفلاتوکسین‌هـای G_1، B_2 و G_2 بـه ترتیـب 50، 20 و 10 درصد سـمیت آفلاتوکسـین B_1 در گونـه‌هـای مختلـف حیوانی و سلول‌هـای پسـتانداران در محـیط‌هـای کشـت بوده است(3،2). در بین گونه‌های مختلف طیور و در بـین سن‌های مختلف، تفاوت در حساسـیت بـه مسـمومیت بـا آفلاتوکسین وجود دارد. آفلاتوکسین B_1 در سطوح کم‌تـر از نصف LD_{50} موجب مسمومیت شدید کبدی می‌گردد. کبد محل اصلی مسمومیت زدایی از آفلاتوکسین بوده و سمی بودن آفلاتوکسین B_1 بـرای کبـد، تقریبـا در تمـام حیوانات به اثبات رسیده است. متابولیت‌هـای آفلاتوکسـین به‌طور عمده از طریق صـفرا، ادرار و ترشـحات دسـتگاه گوارش دفع می‌گردند. متابولیـت‌هـای آفلاتوکسـین بـر خلاف شیب غلظت پلاسمایی، بـا نـرخ دفـع بـیش‌تـری نسبت به سایر روش‌های دفع، به صفرا ترشح می‌شـوند(6-4). تبدیل زیستی آفلاتوکسین در جهت مسمومیت‌زدایـی و تسهیل دفـع، شـامل مراحـل ابتـدا اکسیداسـیون، احیـا و هیدرولیز و سپس ترکیب با مواد بـا منشـا داخلـی جهـت افزایش حلالیت در آب می‌باشد. تجمع آفلاتوکسـین‌هـا در بدن نیز عمدتا در کبد و کلیه‌ها صورت می گیرد کـه در تبدیل زیستی آن‌ها دخالت دارند. مرغ هـای گوشـتی و تخمگـذار مـی‌تواننـد قسـمت عمـده آفلاتوکسـین B_1 موجـود در خـوراک مصـرف شـده را متـابولیزه و دفـع کنند(7). در حالت ایجاد مسمومیت مزمن با آفلاتوکسین در مرغ‌های مادر که تولیدکننده تخم مرغ نطفه‌دار بـرای تولید جوجه یکروزه گوشـتی هسـتند، رانـدمان غـذایی، میزان وزن‌گیری، تولید تخم مرغ (به دلیل کاهش سنتز و انتقال مـواد پـیش‌سـاز زرده در کبـد) و توانـایی جوجـه درآوری تخم‌های آن‌ها کاهش می‌یابد. حساسـیت ایـن مرغ‌ها به شاخص کاهش تولید تخم مرغ بیش‌تر از کـاهش جوجه درآوری و مرگ و میـر جنینـی بـوده اسـت، کـه نشان دهنده ورود کم‌تر این سم به تخم مرغ می‌باشد(8).

در صورت وجود مقدار زیاد آفلاتوکسین در جیـره مرغ‌های تخمگذار، شاخص‌های وزن تخم مرغ و تولیـد تخم مرغ که شاخص‌های اقتصادی مهمی برای پـرورش دهنده مرغ تخمگـذار مـی‌باشـد، کـاهش یافتـه و سـریعاً جلب توجه نموده و تولید کننده تخـم مـرغ را از وجـود مشکل جدی در مزرعه آگاه می‌سازد. لذا موارد مسـمومیت حـاد بـا آفلاتوکسـین بـه علـت ایجـاد زیـان اقتصـادی چشمگیر، سریعاً مدیریت می‌شوند. گزارش منـابع نشـان مـی‌دهـد مقـادیر آفلاتوکسـینی کـه بـه‌طـور طبیعـی در خوراک طیور یافت می‌شود بـه طـور متوسـط کـم‌تـر از 200 میکروگرم در کیلوگرم مـی‌باشـد(9، 10)، بنـابراین، با توجه به وجود حـداقل 500 میکروگـرم آفلاتوکسـین در کیلوگرم خوراک، میزان ضریب ناچیز انتقال سم بـه تخم مرغ و توانایی مرغان در سم‌زدایی سریع و مـوثر از آفلاتوکسین، احتمـالاً از منظـر بقایـای آفلاتوکسـین در فرآورده‌های طیور مانند تخم مرغ، مقادیر نـاچیزی بـاقی مانده ممکن است وجود داشته باشد(11).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-04]

اکراتوکسین از مشتقات ایزوکومارین و محصول اصلی بیش‌تر گونه‌های آسپرژیلوس و پنی‌سلیوم است. اکراتوکسین A (OTA) فراوان‌ترین و سمی‌ترین مایکوتوکسین در میان این گروه و از گونه نفروتوکسین‌ها است که باعث بروز صدمات جدی در کلیه، کاهش وزن‌گیری، کاهش بهره وری خوراک و افزایش شیوع بیماری‌ها شده و همچنین توانایی سرکوب سیستم ایمنی را نیز دارد(12).

این سم از نظر عامل تلفات در طیور، قوی‌تر از انواع آفلاتوکسین نیز می‌باشد. در بسیاری موارد مصرف مداوم جیره ای که به مقدار کمی از این نوع سم آلوده است، منجر به تلفات مستقیم نمی‌شود بلکه با کاهش عملکرد گله موجب ضرر اقتصادی در پایان دوره پرورش خواهد شد. به‌طور کلی، میزان اکراتوکسین A در خوراک‌های حیوانی در مقایسه با مواد غذایی انسانی بیش‌تر است. خوراک دام، طیور و آبزیان عموماً از غلات و حبوبات و فرآورده‌های جانبی آن‌ها تشکیل شده است که محیط مناسبی برای رشد سویه‌های قارچی تولیدکننده سم اکراتوکسین می‌باشند(13).

تخم‌مرغ نه تنها یک وعده غذایی مقبول از دیدگاه طعم، منبع غذایی کامل و همچنین عنصر جدایی‌ناپذیر برای تهیه بسیاری از غذاها است، بلکه به عنوان یک منبع غذایی طبیعی و کامل در سفره غذایی ایرانیان مطرح می‌باشد. این ویژگی، به علت مواد مغذی استثنایی تخم مرغ است که به عنوان منبع قابل توجهی از پروتئین با کیفیت بالا که دارای تمام 9 اسید آمینه ضروری و مقادیر عمده‌ای از ویتامین‌ها و مواد معدنی ضروری است، مورد توجه می‌باشد(14). علاوه بر این کولین تخم مرغ صرف نظر از تأثیر قابل توجهی که بر روی عملکرد مغز و سیستم عصبی برای رشد و نمو جنین و کودک و همچنین تقویت حافظه دارد، بر روی سلامت قلب و عروق نیز موثر است(15). استان مازندران واقع در شمال ایران، دارای آب و هوای معتدل با رطوبت بالا است که از جمله عواملی می‌باشد که باعث افزایش آلودگی قارچی و نهایتاً افزایش تولید مایکوتوکسین‌ها در انواع مواد غذایی و خوراک دام و طیور می‌شود. با در نظر گرفتن جایگاه ویژه‌ای که تخم مرغ در سفره غذایی ایرانیان دارد و به دلیل احتمال آلودگی خوراک دام و طیور به کپک و بعضا تغذیه آن‌ها با نان کپک زده، در این مطالعه به بررسی تخم مرغ‌های توزیع شده در سه شهر استان مازندران از لحاظ میزان آلودگی به برخی مایکوتوکسین‌ها پرداخته شد تا علاوه بر حصول آگاهی از سلامت آن‌ها، بتوان به روشی دقیق با توان تشخیصی قابل قبول برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین و اکراتوکسین در تخم مرغ دست یافت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، فسفات هیدورژن دی سدیم بدون آب، فسفات دی هیدروژن پتاسیم، کلرید سدیم، برمید پتاسیم، کلرید پتاسیم، اسید نیتریک، استو نیتریل، متانول، آب با درجه خلوص کروماتوگرافی مایع، هگزان نرمال یا سیکلو هگزان، ساخت شرکت مرک آلمان تهیه شدند. محلول استاندارد ذخیره آفلاتوکسین‌ها شامل 1000 نانوگرم از انواع آفلاتوکسین B_1,G_1 و 200 نانوگرم از انواع B_2,G_2 در یک میلی‌لیتر متانول می‌باشد. جهت اندازه‌گیری اکراتوکسین، محلول استاندارد ذخیره اکراتوکسین، شامل 1000 نانوگرم از آنالیت اکراتوکسین A در یک میلی لیتر حلال بنزن- اسید استیک به نسبت حجمی 99 حجم بنزن، 1 حجم اسید استیک، از شرکت ایرانی علوم حیاتی فاروق، مورد استفاده قرار گرفتند.

از کیت الایزا با برند Bio-Shield از شرکت Prognosis کشور یونان برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین و کیت با برند Neogen Europe ساخت کشور آلمان جهت اندازه‌گیری اکراتوکسین استفاده شد. تعداد 45 نمونه تخم مرغ شامل سنتی و صنعتی، به‌صورت تصادفی از سطح عرضه سه شهر از شهرهای استان مازندران (بابلسر، قائم‌شهر و ساری) در تابستان سال 1398 طی دو مرحله نمونه برداری شدند. در مرحله اول 30 نمونه (جهت

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-04]

آزمون افلاتوکسین توتال با روش HPLC[1]) و در مرحله دوم 15 نمونه جهت آزمون آفلاتوکسین توتال با هر دو روش الایزا و HPLC و همچنین اندازه‌گیری اکراتوکسین با هر دو روش الایزا و HPLC مورد مطالعه قرار گرفتند. در تمامی موارد از هر سری از نمونه‌ها، 3 عدد تخم مرغ جمع‌آوری و جهت آماده‌سازی نمونه و سنجش موارد یاد شده، به آزمایشگاه ارسال شدند.

آماده سازی نمونه تخم مرغ برای آزمون آفلاتوکسین توتال با روش های الایزا و HPLC

جهت اندازه‌گیری آفلاتوکسین از دستگاه HPLC مجهز به دتکتور فلورسانس با طول موج تهییجی 365 nm و طول موج نشری 435 nm و ستون با فاز معکوس C_{18} و کبری سل استفاده شده است. محلول فاز متحرک: 6 حجم آب+3 حجم متانول+ 2 حجم استو نیتریل+ 350 میکرولیتر HNO_3 با مولاریته 4 و 0/12 گرم KBr به ازای یک لیتر و سرعت جریان 1 ml/min و حجم تزریق 100 µl انتخاب شده است(16). در آماده‌سازی نمونه تخم مرغ برای روش‌های الایزا و HPLC در آزمون آفلاتوکسین Total، ابتدا زرده و سفیده تخم مرغ را مخلوط کرده، سپس 5گرم از نمونه، وزن شده و با متانول 70 درصد به حجم 25 میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به مدت 10 دقیقه ورتکس شده و در دمای 5°c- به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. 15 ml از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ برداشته و پس از انتقال به دکانتور، 4/5 میلی‌لیتر هگزان نرمال به آن افزوده شد. پس از دو فاز شدن، 15 ml فاز آبی را جدا کرده و 5ml برای آزمون الایزا (کیت با برند Bio-Shield از شرکت Prognosis کشور یونان) برداشته شد. 10 Ml باقیمانده از فاز آبی ابتدا با استفاده از گاز نیتروژن به حجم 5 میلی‌لیتر رسانده و درنهایت با آب مقطر دیونیزه به حجم 10 ml رسانده و از ستون ایمینوافینیتی مخصوص آفلاتوکسین با برند Bio-TeZ آلمان عبور داده شد. به منظور حذف ترکیبات ناخواسته ابتدا 10 ml آب مقطر از ستون ایمینوافینیتی عبور داده و پس از خشک کردن با فشار هوای مثبت، نهایتا آفلاتوکسین جذب شده، با عبور 1500 µl متانول واجذب شده و پس از رقیق‌سازی با 1500µl آب مقطر، ورتکس و سپس فیلتراسیون با PTFE، در نهایت به دستگاه HPLC تزریق شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون برای B_1,G_1 از گستره 0/36-3/6ppb و برای B_2,G_2 از گستره 0/07-0/72 ppb استفاده شد.

آماده سازی نمونه تخم مرغ برای آزمون اکراتوکسین با روش های الایزا و HPLC

تعداد 15 نمونه تخم مرغ شامل سنتی و صنعتی و از هر نمونه 3 عدد از سطح عرضه سه شهر از شهرهای استان مازندران (بابلسر، قائمشهر و ساری) جمع آوری و به آزمایشگاه ارسال شدند.

در آماده‌سازی نمونه تخم‌مرغ برای روش‌های الایزا و HPLC در آزمون اکراتوکسین A، ابتدا زرده تخم مرغ را جدا کرده، سپس 5گرم از آن با متانول 70درصد به حجم 25 میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به مدت 10 دقیقه ورتکس شده و در دمای 5°c- به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. 15 ml از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ برداشته و پس از انتقال به دکانتور، 4/5 میلی‌لیتر نرمال هگزان به آن افزوده شد. پس از دو فاز شدن، 15 ml فاز آبی را جدا کرده و 5 ml برای آزمون الایزا (کیت با برند Neogen Europe) برداشته شد.

جهت تخلیص اکراتوکسین A در روش HPLC، 10 ml مابقی از ستون ایمینوافینیتی مخصوص اکراتوکسین با برند Bio TeZ آلمان عبور داده شد. در ادامه پس از عبور 10ml آب مقطر و خشک کردن با فشار هوای مثبت، نهایتا ستون با عبور 1500 µl متانول-اسید استیک به نسبت حجمی 98 به 2 واجذب شده و پس از رقیق‌سازی با 1500µl آب مقطر، ابتدا ورتکس، سپس با PTFE فیلتر و در نهایت به دستگاه HPLC تزریق شد. برای اندازه‌گیری اکراتوکسین A از دستگاه

1. High performance liquid chromatography

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-04]

HPLC مجهز به دتکتور فلورسانس با طول موج تهییجی 333 nm و طول موج نشری 477nm و ستون با فاز معکوس C_{18} و کبری سل استفاده شده است. محلول فاز متحرک: 99 حجم آب +99 حجم استونیتریل+ 2حجم اسید استیک می‌باشد. سرعت جریان: 1 ml/min و حجم تزریق: 100µl انتخاب شد(17). برای اندازه‌گیری اکراتوکسین A به روش الایزا، ابتدا 100 میکرولیتر از کانجوگیت در هر چاهک قرمز ریخته شد. سپس 100 میکرولیتر از استانداردهای اکراتوکسین (غلظت‌های 0، 2، 5 ، 10و 25ppb) به ترتیب از A_1 تا E_1 در چاهک‌های قرمز ریخته شد. 100 میکرولیتر از نمونه‌های آماده شده نیز در مابقی چاهک‌ها ریخته شدند. سه بار محتویات هر چاهک را با کمک سمپلر پر و خالی کرده تا مخلوط شوند. سپس 100 میکرولیتر از هر چاهک برداشته به چاهک‌های سفید محتوی آنتی‌بادی منتقل گردید. پلیت پوشانده و به مدت چند ثانیه تکان داده شد. به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق و در محیطی تاریک انکوبیت شد. بعد از10دقیقه محتویات چاهک‌ها خارج و 5 بار با آب مقطر شستشو داده شد و 3 بار هم بر روی دستمال کاغذی به‌صورت وارونه و به آرامی ضربه زده شد. 100 میکرولیتر از سوبسترا به چاهک‌ها اضافه و پلیت پوشانده و به مدت چند ثانیه تکان داده شد. سپس به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق و در محیطی تاریک انکوبیت شد. بعد از این مرحله 100 میکرولیتر محلول متوقف‌کننده (stop solution) به هر چاهک اضافه گردید. نتایج در مدت زمان 20 دقیقه بعد از ریخته شدن محلول متوقف‌کننده خوانده شد. جهت رسم منحنی کالیبراسیون برای استانداردهای تزریقی به دستگاه HPLC در گستره غلظت ppb 10، 7/5، 5، 2/5، 1 استفاده شد.

یافته ها

نمونه‌ها پس از آماده‌سازی و استخراج آفلاتوکسین و تخلیص توسط ستون ایمیونوافینیتی، با استفاده از روش HPLC مورد آنالیز قرار گرفتند. که از این تعداد، در حدود 20 درصد هیچکدام از آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 قابل تشخیص نبوده (ND) و در حدود 80 درصد مابقی نیز فقط آفلاتوکسین G_2 با مقدار ناچیز شناسایی شد. مقدار G_2 شناسایی شده از حداقل 0/010 تا حداکثر ppb 4/726 تشخیص داده شد که به مراتب از حد مجاز در نظر گرفته شده برای مواد غذایی که حداکثر ppb 15 برای آفلاتوکسین توتال در انواع مواد غذایی است، کم‌تر می‌باشند (جدول شماره 1).

در این پژوهش تلاش شد با بهینه سازی روش‌های استخراج نمونه، قابلیت دستگاه الایزا در مقایسه با HPLC (به عنوان Gold Standard) نیز مورد بررسی قرار گیرد. درصد ریکاوری روش آزمون (شامل مرحله استخراج با حلال، مرحله جذب و واجذب از ستون ایمیونوافینیتی) با استفاده از نمونه استاندارد با غلظت مشخص و همچنین نمونه تخم‌مرغ آغشته به مایکوتوکسین‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان داد، با کاهش درصد متانول محلول عبوری از ستون ایمیونوافینیتی راندمان یا ریکاوری بهبود یافت. در نهایت با استفاده از محلول حاوی متانول 35 درصد بیش‌ترین راندمان (85 درصد) حاصل شد. همچنین به‌دلیل عدم دسترسی به نمونهCRM، صحت روش به‌وسیله آغشته کردن نمونه تخم مرغ با محلول استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. برای ارزیابی دقت روش آزمون نیز از یک نمونه مشخص 5 بار تکرار صورت گرفت.

همچنین اندازه‌گیری آفلاتوکسین توتال با روش الایزا با کیت Bio-Shield بر روی 15 نمونه مرحله دوم انجام شد. نتایج نشان داد که فقط یک مورد آلوده به آفلاتوکسین توتال می باشد که مقدار یافت شده (0/72 میلی‌گرم بر کیلوگرم) از بیشینه رواداری برای آفلاتوکسین توتال در انواع مواد غذایی (15 ppb) بسیار کم‌تر است.

در ادامه میزان اکراتوکسین A در نمونه‌های مرحله دوم، با هر دو روش HPLC و الایزا (با کیت Neogen مورد آنالیز قرار گرفتند (جدول شماره 2). نتایج حاصل از آزمون اکراتوکسین A نشان می‌دهد که میزان

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-04]

اکراتوکسین در تمامی نمونه ها در هر دو روش غیر قابل تشخیص گزارش شده است. لازم به ذکر است که حد تشخیص (LOD) انواع آفلاتوکسین در دستگاه HPLC برای B_1 ، B_2، G_1 و G_2 به ترتیب 0/0516533، 0/020309009، 0/036064403، 0/004639218 میلی گرم بر کیلوگرم و حد تشخیص HPLC برای اکراتوکسین 0/518679 میلی گرم بر کیلوگرم به‌دست آمده است. حد تشخیص الایزا برای آفلاتوکسین توتال 1ppb برای کیت Bio-Shield و همچنین حد تشخیص الایزا برای اکراتوکسین 1ppb برای کیت Neogen می‌باشد.

جدول شماره 1: میزان آفلاتوکسین نمونه‌های تخم مرغ جمع‌آوری شده از سطح توزیع شهرهای بابلسر(B)، قائم‌شهر(G) و ساری (S) در استان مازندران با استفاده از دستگاه HPLC

HPLC					#
B_1(ppb)	B_2(ppb)	G_1(ppb)	G_2(ppb)		
ND	ND	ND	0/063	S1	1
ND	ND	ND	0/043	S2	2
ND	ND	ND	ND	S3	3
ND	ND	ND	0/068	S4	4
ND	ND	ND	ND	S5	5
ND	ND	ND	0/076	S6	6
ND	ND	ND	0/026	S7	7
ND	ND	ND	0/111	S8	8
ND	ND	ND	ND	S9	9
ND	ND	ND	0/072	S10	10
ND	ND	ND	4/726	B1	11
ND	ND	ND	0/522	B2	12
ND	ND	ND	ND	B3	13
ND	ND	ND	0/126	B4	14
ND	ND	ND	0/040	B5	15
ND	ND	ND	0/211	B6	16
ND	ND	ND	ND	B7	17
ND	ND	ND	0/125	B8	18
ND	ND	ND	0/112	B9	19
ND	ND	ND	0/081	B10	20
ND	ND	ND	0/147	G1	21
ND	ND	ND	0/086	G2	22
ND	ND	ND	0/052	G3	23
ND	ND	ND	0/042	G4	24
ND	ND	ND	ND	G5	25
ND	ND	ND	0/051	G6	26
ND	ND	ND	0/059	G7	27
ND	ND	ND	0/101	G8	28
ND	ND	ND	ND	G9	29
ND	ND	ND	ND	G10	30
ND	ND	ND	0/027	S11	31
ND	ND	ND	ND	S12	32
ND	ND	ND	0/056	S13	33
ND	ND	ND	0/065	S14	34
ND	ND	ND	0/037	S15	35
ND	ND	ND	0/026	B11	36
ND	ND	ND	0/030	B12	37
ND	ND	ND	0/031	B13	38
ND	ND	ND	0/045	B14	39
ND	ND	ND	0/033	B15	40
ND	ND	ND	0/024	G11	41
ND	ND	ND	0/024	G12	42
ND	ND	ND	0/086	G13	43
ND	ND	ND	0/040	G14	44
ND	ND	ND	0/063	G15	45

جدول شماره 2: میزان آفلاتوکسین و اکراتوکسین نمونه های تخم مرغ جمع آوری شده در مرحله دوم از سطح توزیع شهرهای بابلسر(B)، قائمشهر(G) و ساری (S) در استان مازندران با استفاده از دستگاه HPLC و Elisa

Elisa (Neogen)	HPLC	Elisa (Bio shield)		
Ochratoxin	Ochratoxin	Aflatoxin Total ppb		#
ND	ND	ND	S11	1
ND	ND	ND	S12	2
ND	ND	ND	S13	3
ND	ND	0/72	S14	4
ND	ND	ND	S15	5
ND	ND	ND	B11	6
ND	ND	ND	B12	7
ND	ND	ND	B13	8
ND	ND	ND	B14	9
ND	ND	ND	B15	10
ND	ND	ND	G11	11
ND	ND	ND	G12	12
ND	ND	ND	G13	13
ND	ND	ND	G14	14
ND	ND	ND	G15	15

بحث

با توجه به احتمال آلودگی خوراک مرغ‌های تخمگذار صنعتی و همچنین تغذیه طیور خانگی با نان کپک زده، ابتدا 30 نمونه تخم‌مرغ سنتی و صنعتی از سطح عرضه سه شهر در استان جمع‌آوری شدند و از لحاظ وجود آفلاتوکسین‌های گروه B و G توسط روش HPLC مورد آزمایش قرار گرفتند. با توجه به وجود آفلاتوکسین G_2 در تعدادی از نمونه‌ها که نشان دهنده فعالیت قارچ آسپرژیلوس و وجود آفلاتوکسین در جیره غذایی مرغ‌های مربوطه می‌باشد، آزمایش با 15 نمونه جدید از همان شهرها و این بار با هر دو روش الایزا و HPLC تکرار گردید. همچنین به دلیل فراوانی سم قوی و خطرناک اکراتوکسین A در خوراک طیور (که عمدتاً از غلات می‌باشند)، وجود این سم را که ساختار متیل استری داشته(18) و در حلال‌های آلی قطبی به خوبی حل می‌شود، در زرده 15 نمونه تخم‌مرغ سری دوم مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه سعی شد با توجه به هزینه بالای تامین دستگاه HPLC برای بسیاری از مراکز تحقیقاتی و خدمات آزمایشگاهی، قابلیت روش الایزا به عنوان یک روش جایگزین برای انجام آزمون آفلاتوکسین و اکراتوکسین برای نمونه تخم مرغ مورد بررسی قرار گیرد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-04]

با توجه به نتایج بدست آمده در تعدادی از نمونه‌ها تنها سم آفلاتوکسین G_2 که ضعیف‌ترین سم از این دسته می‌باشد(2) شناسایی گردید، که این امر می‌تواند نشانه متابولیزه شدن سموم خطرناک‌تر در بدن مرغ و تبدیل آن‌ها به اشکال ضعیف‌تر مانند آفلاتوکسیکول باشد(3). مقایسه نتایج حاصل از اندازه‌گیری با روش HPLC با داده‌های به‌دست آمده از روش الایزا می‌تواند نشان دهنده این باشد که دقت و حساسیت روش الایزا در حد HPLC نبوده و به‌نظر می‌رسد که کیت‌های مورد استفاده توان تشخیص آفلاتوکسین در مقادیر کم در تخم‌مرغ را ندارند، اگرچه به نظر می‌رسد تحقیقات بیش‌تری در این خصوص باید انجام پذیرد. نتایج به‌دست آمده با گزارشات حاصل از بررسی‌های پیشین همسو بوده و بیانگر این واقعیت می‌باشد که میزان آلودگی تخم‌مرغ‌های حاصل از مرغ‌های تخمگذار تغذیه شده با جیره غذایی با احتمال آلودگی، بسیار ناچیز می باشد.

نتایج تعدادی از تحقیقات نشان داده است که در تخم مرغ مرغ‌های تخمگذار بعد از تغذیه اجباری به مدت 7 روز از جیره‌های آلوده شده به مقادیر زیاد آفلاتوکسین نزدیک به غلظت‌های مسمومیت‌زا که منجر به ایجاد مرگ و میر نیز گردیده است (400-100 قسمت در میلیون)، آفلاتوکسین B_1 (به مقدار 3/3-0/2 قسمت در بیلیون: نسبت انتقال به تخم مرغ= 500000 تا 1320 به 1)، آفلاتوکسیکول و سایر متابولیت‌های آفلاتوکسین به غیر از M_1 دفع کرده اند. آفلاتوکسین M_1 فقط در بافت کلیه‌های این مرغ‌ها یافت شد. مدت 7 روز بعد از حذف آفلاتوکسین از جیره، مقادیر ناچیزی از آفلاتوکسیکول در تخم‌مرغ یافت شد. بقایای آفلاتوکسینی در تخم‌مرغ با نرخی مشابه با افزایش آن، کاهش پیدا کرد. همچنین، نیمه عمر کل آفلاتوکسین‌های نشان دار شده با ^{14}C در بدن مرغ تخمگذار 67 ساعت برآورد شد. کاهش تولید تخم مرغ، کاهش وزن تخم‌مرغ، افزایش چربی کبد و تغییر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم، بارزترین علائم مسمومیت مزمن آفلاتوکسینی در مرغ های تخمگذار گزارش شده است(1،2،6،19،20). مطابق بررسی‌های انجام شده، با تزریق وریدی آفلاتوکسین B_1 نشاندار شده با C^{14} به جوجه‌های مرغ تخمگذار نیمه عمر پلاسمایی آن 1/5 دقیقه محاسبه شد. این سم به سرعت در صفرا ظاهر شده و غلظت آن به 7 برابر مقادیر پلاسما رسید. نسبت ماده نشاندار دفع شده از صفرا، ادرار و محتویات روده به ترتیب مقادیر 70، 15 و 15 درصد بود(6). اگرچه آفلاتوکسین در کبد و ماهیچه جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های آلوده (1mg آفلاتوکسین نشان دارشده با C^{14}) یافت می‌شود، نتایج آزمایشات نشان داده است که در مدت نسبتاً کوتاهی بعد از حذف توکسین از جیره، جوجه‌ها می‌توانند آفلاتوکسین را متابولیزه و از بافت‌های بدنی خود حذف کنند. برای کاهش معنی‌دار بقایای آفلاتوکسینی از بافت‌های خوراکی، 72 ساعت زمان نیاز است(21).

در مرغ های تخمگذار دریافت کننده جیره آلوده شده با حداقل 500 میکروگرم آفلاتوکسین B_1 در کیلوگرم خوراک، گرچه تولید تخم مرغ تحت تاثیر قرار نگرفت، ولی بقایای آفلاتوکسین B_1 در تخم مرغ یافت شد و نسبت انتقال سم آفلاتوکسین B_1 از خوراک به تخم مرغ معادل 5000 به 1 گزارش شد(11). در تحقیق مشابه دیگری با تغذیه مرغ‌های تخمگذار از سطوح مختلف آفلاتوکسین B_1 (190 تا 965 قسمت در بیلیون) نسبت انتقال آفلاتوکسین B_1 از خوراک به تخم مرغ معادل 1350-450 به 1 محاسبه شد(20). در مطالعه دیگری نیز با تغذیه مرغ‌های تخمگذار از سطوح مختلف آفلاتوکسین B_1 (25 تا 100 قسمت در بیلیون) نسبت انتقال آفلاتوکسین B_1 از خوراک به تخم مرغ معادل 1430-625 به 1 محاسبه شد(3). در بررسی وجود بقایای آفلاتوکسینی در تخم مرغ‌های موجود در سوپرمارکت‌ها مشاهده شده است که تمامی تخم مرغ‌ها حاوی بقایای آفلاتوکسینی نیستند و تنها در درصدی از تخم‌ها ممکن است بقایای آفلاتوکسینی یافت شود

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-04]

(16-30 درصد) که ممکن است بر تفاوت در توانایی‌های فردی و وضعیت سلامتی مرغ‌های تخمگذار در خنثی‌سازی سم دلالت کند(5). روش‌های گوناگونی برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین در مواد غذایی از قبیل Elisa، TLC و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) با دتکتورهای فلورسانس و MS/MS برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین مورد استفاده قرار گرفته است. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با دتکتورهای فلورسانس از بهترین روش‌ها برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌های گروه B و G در مواد غذایی می‌باشد(22). سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO) میزان استاندارد و حد مجاز آفلاتوکسین در مواد غذایی انسان را 5 میکروگرم بر کیلوگرم اعلام نموده که کشور ما نیز از این قانون پیروی می کند(23).

نتایج حاصل از بررسی سلامت تخم مرغ‌های جمع‌آوری شده از سطح استان مازندران نشان داد که تعدادی از نمونه‌ها تنها حاوی مقادیر بسیار کم آفلاتوکسین G_2 می‌باشند که نشان می‌دهد علی‌رغم احتمال بالای وجود و فعالیت قارچ آسپرژیلوس در جیره غذایی مرغان تخمگذار این سموم در بدن مرغ متابولیزه شده و مقدار بسیار ناچیزی از آفلاتوکسین G_2 که کم خطرترین آن‌هاست وارد تخم مرغ می‌شود. بنابراین مطابق گزارشات حاصل از سایر مطالعات و نتایج حاصل از مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که می‌توان تخم مرغ را به عنوان یک منبع غذایی طبیعی، ایمن از لحاظ احتمال آلودگی به مایکوتوکسین‌های گروه B و G و اکراتوکسین و همچنین قابل استفاده برای تمام اقشار جامعه در تمام سنین و با کم‌ترین نگرانی در این خصوص در نظر گرفت.

سپاسگزاری

این مطالعه با کدطرح 3073 در معاونت محترم تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مازندران با اخذ کد اخلاق IR.MAZUMS..REC.1397.3073 به تصویب رسیده است و مورد حمایت مالی قرار گرفته است.

References

1. Selamat J, Iqbal SZ. Food safety: Basic concepts, recent issues, and future challenges. Food Saf Basic Concepts, Recent Issues, Futur Challenges. Berlin: Springer; 2016.
2. Dhanasekaran D, Shanmugapriya S, Thajuddin N, Panneerselvam A. Aflatoxins and Aflatoxicosis in Human and Animals. Aflatoxins Biochem Mol Biol 2011; 221-254.
3. Aly SA, Anwer W. Effect of naturally contaminated feed with aflatoxins on performance of laying hens and the carryover of aflatoxin B1 residues in table eggs. Pakistan J Nutr 2009; 8(2): 181-186.
4. Giancarlo B, Elisabetta B, Edmondo C, Valeriana C, Giuseppina T. Determination of ochratoxin A in eggs and target tissues of experimentally drugged hens using HPLC-FLD. Food Chem 2011; 126(3): 1278-1282.
5. Shehata AA, Ali H, Ghazali NH. Detection of Aflatoxin and antibacterial residues in different types of table eggs with studying of the effect of heat treatment. BENHA VETER MED J 2014; 27(2): 177-187.
6. El-yazeed HA, Hanafy H, Soliman NR, Refai M. Trials for Reducing Aflatoxin B 1 Residues in Chicken Meat and Eggs using a Newly Developed Aflatoxin B 1 Vaccine. 2015; 3(11): 6-14.
7. Putt DA, Ding X, Coon MJ, Hollenberg PF. Metabolism of aflatoxin B1 by rabbit and rat nasal mucosa microsomes and purified cytochrome P450, including isoforms 2A10

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-04]

and 2A11. Carcinogenesis 1995; 16(6): 1411-1417.

8. Wacoo AP, Wendiro D, Vuzi PC, Hawumba JF. Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops. J Appl Chem 2014; 2014: 1-15.
9. Pal M, Gizaw F, Abera F, Shukla PK, Hazarika RA. Mycotoxins : A growing concern to human and animal health. Beverage Food world 2015; 42(5): 42-50.
10. Pourelmi MR, Palizdar MH, Shirali S, Barami AR. Aflatoxin B1 contamination in local and industrial eggs measured by ELISA technique in Mazandaran. Europ J Zoological Res 2013; 2(6): 89-92.
11. Oliveira CA, Kobashigawa E, Reis TA, Mestieri L, Albuquerque R, Correa B. Aflatoxin B1 residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. Food Addit Contam 2000; 17(6): 459-462.
12. Curtui VG, Gareis M, Usleber E, Märtlbauer E. Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B, and zearalenone. Food Addit Contam 2001; 18(8): 730-738.
13. Petzinger E, Weidenbach A. Mycotoxins in the food chain: The role of ochratoxins. Livestock Product Sci 2002; 76(3): 245-250.
14. Smolders L, DeWit NJW, Balvers MGJ, Obeid R, Vissers MMM, Esser D. Natural choline from egg yolk phospholipids is more efficiently absorbed compared with choline bitartrate; outcomes of a randomized trial in healthy adults. Nutrients 2019; 11(11).
15. Melough MM, Chung SJ, Fernandez ML, Chun OK. Association of eggs with dietary nutrient adequacy and cardiovascular risk factors in US adults. Public Health Nutr 2019; 22(11): 2033-4042.
16. Institute of standards and Industrial Research of Iran. Food and feed stuffs -Determination of aflatoxins B&G by HPLC method using immunoaffinity column clean up-Test method. (2011); ISIRI, NO.6872. 1st Revision. (Persian).
17. Institute of standards and Industrial Research of Iran. Foodstuffs-Cereal and cereal's products-Determination of ochratoxin A by HPLC method and immunoaffinity column clean up-Test method; ISIRI, NO.9238. 1st ed. Institute of Standards and Industrial Research of Iran; 2010. (Persian).
18. Ringot D, Chango A, Schneider YJ, Larondelle Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. Chem Biol Interact 2006; 159(1): 18-46.
19. Sawhney DS, Vadehra DV, Baker RC. The metabolism of 14C aflatoxins in laying hens. Poult Sci. 1973; 52(4): 1302-1309.
20. Wolzak A, Pearson AM, Coleman TH, Pestka JJ, Gray JI. Aflatoxin deposition and clearance in the eggs of laying hens. Food Chem Toxicol 1985; 23(12): 1057-1061.
21. Obioha WI, Stahr HM, Kraft AA. Distribution and effects of aflatoxin in chicken tissues after feeding radiolabeled (14C) aflatoxin B1. J Food Prot 1986; 49(10): 799-805.
22. Houshyarfard M, Javadi D. The Aspergillus flavus susceptibility of hazelnut varieties (Corylus avellana L.) in laboratory conditions. J Nuts 2018;9(2): 181-188 (Persian).
23. Alshannaq A, Yu JH. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. Int J Environ Res Public Health 2017; 14(6): 623.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-04]