المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٦، عدد إضافي ٢، ٢٠١٢ (١١١-١١٤)
وقائع المؤتمر العلمي السادس، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

استخدام تقنية الادمصاص المناعي المرتبط بالإنزيم للكشف عن سم الافلا م١ في القيمر

سناء داؤد الصواف و عمر احمد عبدالله

فرع الصحة العامة البيطرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

الخلاصة

شملت هذه الدراسة الكشف عن سم الافلا M_1 في ٥٠ عينة قيمر، ثلاثون منها صنعت من حليب الجاموس الخام في المختبر و٢٠ عينة جمعت من مختلف الأسواق المحلية لمدينة الموصل وذلك باستخدام طريقة الادمصاص المناعي المرتبط بالأنزيم. أوضحت النتائج أن ٩٠% من عينات القيمر المصنعة من حليب الجاموس الخام كانت موجبة لسم الافلا M_1 وبمعدل تلوث ١٦,١٦٤ نانوغرام /كغم، وكما بينت نتائج توزيع سم الافلا M_1 في القيمر المصنع أن ٣,٣% من العينات كانت بمستويات أعلى من الحد المسموح به. أما في ما يخص القيمر المحلي فقد أظهرت الدراسة وجود تلوث بسم الافلا M_1 في القيمر المحلي أعلى مما هو عليه في القيمر المصنع وبمعدل تلوث ٢٩,١٥٨ نانوغرام /كغم وان ١٥% من العينات كانت حاويه على سم الافلا M_1 أعلى من الحد المسموح به طبقا للمواصفات القياسية للمفوضية الأوربية والبالغ ٥٠ نانوغرام /كغم.

Using ELISA technique for the detection of aflatoxin M_1 in thick cream

S.D. AL-Sawaf and O.A. Abdullah

Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract

This study involved a disclosure of Aflatoxin M_1 in 50 samples of thick cream (Gaymer), 30 were manufactured from raw buffalo milk and 20 were collected from local markets of different regions in Mosul city, by using Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method. The results revealed that 90% of the manufactured thick cream were positive to residual AFM_1, with a mean value of 16.164 ng/Kg. Only 3.3% of the manufactured thick cream samples had a concentration values above the permissible limits. Within the same subject, local thick cream samples showed a higher AFM_1 level than the manufactured samples with a mean of 29.158 ng/Kg and 15% of local thick cream samples had higher AFM_1 than the permissible limits according to European Commission. (i.e 50 ng /Kg).

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

المقدمة

إن مصطلح السموم الفطرية (Mycotoxins) يطلق على المنتجات الايضيه الثانويه (Secondary metabolites) التي تنتج من قبل الاعفان Fungi وان كلمة Mycotoxin مشتقة من اللغه اليونانية حيث أنMykes تترجم فطر وToxikon تترجم سم (1). وتعد سموم الافلا Aflatoxins مجموعة سامة ومسرطنة تنتج كمؤيضات ثانوية (Secondary metabolites) لبعض سلالات الاعفان الخيطية الدقيقة (filamentous micro-fungi) من جنس الرشاشيات التي أهمها Aspergillus flavus A. nomius, A parasiticus, اثناء نموها على الحبوب والأغذية (2،3). إن سم الافلا M_1 يعد ناتج أيضي لسم الافلا B_1 يطرح مع الحليب عند تناول الحيوان لأعلاف ملوثة بسم الافلا B_1 (4). إن حدوث حالات التسمم الحاد بسموم الافلا (Acute aflatoxicosis) غير شائع الحدوث في الإنسان لأنه عادة ما يتجنب تناول الأغذية المتعفنة ظاهريا حيث تكمن خطورة التعرض لسموم الافلا إلى الفعل التراكمي لهذه السموم داخل الجسم والذي قد يؤدي بالنهاية إلى إحداث الطفرات (Mutagenesis) والتسرطن (Carcinogenesis) لاسيما سرطان خلايا الكبد (Hepatocellular carcinoma) فضلا عن تأثيرات سمية أخرى كالتثبيط المناعي (Immunosuppression) والتداخلات الغذائية (Nutritional interference) والتي قد تحدث نتيجة التعرض لسموم الافلا بجرع قليلة ولفترة زمنية طويلة (5). من مصادر التلوث بسموم الافلا هو تناول الحليب ومنتجاته الملوثة بسموم الافلا وذلك لأن الحليب

مهما للعديد من العناصر الغذائية الرئيسة التي يحتاجها الإنسان خاصة الأطفال مثل البروتينات والكالسيوم (6). تمتاز سموم الافلا بثبوتيتها في الحليب الذي يعد المادة الخام الأساسية في صناعة المنتجات اللبنية وان عملية بسترة الحليب وتعرضه للمعاملات المختلفة أثناء التصنيع يؤدي إلى انخفاض ضئيل في مستوى سموم الافلا (7). ونظرا للاستهلاك البشري العالي للحليب ومنتجاته ولما يشكل وجود سموم الافلا من مخاطر على صحة الإنسان فقد اتجهت الكثير من دول العالم إلى وضع تشريعات خاصة بالحدود المسموح بها لتواجد سموم الافلا في الحليب ومنتجاته وفي الأغذية الأخرى والتي تم تحديدها طبقا للتشريعات الخاصة بكل دولة (9,8). تختلف الحدود المسموح بتواجد سم الافلا M_1 في الحليب ومنتجاته من دولة إلى أخرى فمثلا في الولايات المتحدة الحد الأعلى المسموح به من سم الافلا M_1 في الحليب يجب أن لا يزيد عن ٠,٥ مايكروغرام /لتر (10) وان لا يزيد عن ٠,٠٥ مايكروغرام /لتر في أوربا (11). وقد تطورت العديد من الطرائق لتقدير سم الافلا M_1 في الحليب ومنتجاته ومنها الطرائق المناعية والتي أهمها الادمصاص المناعي المرتبط بالإنزيم Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA) (13,12). وبسبب قلة الدراسات حول مدى تواجد سم الافلا M_1 في القيمر لذلك هدفت الدراسة مقارنة بين القيمر الذي جمع من الأسواق المحلية والقيمر المصنع من الحليب الخام للجاموس في المختبر.

المواد وطرائق العمل

عينات القيمر

تم جمع ٢٠ عينة من القيمر من مختلف أسواق مدينة الموصل (العراق) للفترة ما بين أيلول 2008 ولغاية شباط 2009 حيث تم وضعها في عبوات نظيفة سعة ١٠٠ مل وحفظت بدرجة حرارة -١٨م° لحين إجراء عملية تقدير سم الافلا M_1 في تلك العينات.

تصنيع القيمر (الترقيد)

اتبعت طريقة (14) في تصنيع القيمر إذ تم غلي حليب الجاموس لمدة لا تقل عن ١٠ دقائق ثم بعد ذلك سكب في أواني مفلطحة نظيفة ومعقمة وضعت هذه الأواني بدرجة حرارة ١٥-٢٠ م° وبسبب خاصية الجاذبية (Specific gravity) ارتفعت طبقة الدهن إلى الأعلى ثم قشطت هذه الطبقة وبردت وبعد ذلك تم خزن عينات القيمر المصنعة بدرجة التجميد-١٨م° لحين إجراء عملية تقدير سم الافلا M_1 بتقنية الاليزا.

تقدير سم الافلا M1 في عينات القيمر

استخدمت تقنية الادمصاص المناعي المرتبط بالانزيم (Enzyme Linked Immunosorbent Assay ELISA) لغرض التقدير الكمي لسم الافلا M_1 في عينات القيمر حسب تعليمات الشركة المجهزة لعدة الاليزا (Aflatoxin M_1 ELISA Kit Generon company) واستخدم برنامج خاص للحصول على النتائج والمجهز أيضا من نفس الشركة IPS Competitor Software.

المواد المستعملة في تقنية الاليزا

استعملت المواد المجهزة من قبل الشركة المصنعة (Generon company) البلجيكية وأجري الاختبار حسب تعليمات الشركة ألمجهزة لمواد الاختبار.

عينات القيمر

تم اخذ ٣ غم من عينة القيمر وأضيف إليها ٣ مل من محلول FT-Solution ووضعت العينات في حمام مائي بدرجة ٥٠ م° لمدة ١٥ دقيقة وبعد المزج الجيد تم فصل الدهن بجهاز الطرد المركزي على سرعة ٦٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٥ دقيقة ثم أزيلت طبقة الدهن واستخدمت الطبقة السائلة السفلى المتبقية في الاختبار.

خطوات إجراء اختبار الاليزا

تم تحديد ٦ حفر على طبق المزج (Mixing plate) للمحاليل القياسية التي أضيف لكل منها ٦٠ مايكروليتر لتلك الحفر. أضيف ٦٠ مايكروليتر من عينات القيمر إلى الحفر المتبقية. أضيف ٦٠ مايكروليتر من الاجسام المضادة للحفر جميعا، تم التحريك بلطف ثم حضن الطبق لمدة ٥٠ دقيقة بدرجة حرارة الغرفة (٢٠-٢٥ م°) في مكان مظلم. تم نقل ١٠٠ مايكروليتر من كل مزيج الى الحفر المغطاة (coated wells)، تم التحريك بلطف ثم بعد ذلك حضن الطبق لمدة ١٥ دقيقة بدرجة حرارة الغرفة في مكان مظلم. تم تحضير محلول الغسيل بتركيز ١:١٠ وذلك بتخفيف ٢٥ مل من محلول الغسيل 10x مع ٢٢٥ مل ماء مقطر. تم سكب الطبق ومن ثم الغسل باستخدام محلول الغسيل بإضافة ٣٠٠ مايكروليتر من المحلول لكل حفرة ولجميع الحفر بعد ذلك سكبت محتويات الطبق ونشف بمناديل نظيفة، كررت العملية خمس مرات. أضيف ١٠٠ مايكروليتر من المقترن (Conjugate) للحفر جميعا وتم التحريك بلطف وبعد ذلك حضن الطبق لمدة ١٥ دقيقة بدرجة حرارة الغرفة في مكان مظلم. تم سكب محتويات الطبق ومن ثم الغسل بمحلول الغسيل بإضافة ٣٠٠ مايكروليتر للحفر جميعا بعدها سكبت محتويات الطبق ونشف بمناديل نظيفة، كررت العملية ثلاث مرات. بعد أن تمت عملية الغسل أضيف كاشف اللون (Chromogen) بمقدار ١٠٠ مايكروليتر للحفر جميعا وتم التحريك بلطف وحضن الطبق لمدة ٢٠ دقيقة بدرجة حرارة الغرفة في مكان مظلم. بعد انتهاء فترة الحضن أضيف موقف التفاعل (Stop solution) بمقدار ٥٠ مايكروليتر للحفر جميعا وتم التحريك بلطف بعد ذلك تمت قراءة الطبق مباشرة باستخدام القارئ (المطياف) وبطول موجي ٤٥٠ نانوميتر.

تم حساب النتيجة باستخدام برنامج خاص Special software والمجهز من قبل الشركة المصنعة IPS Competitor software

Generon company)) والمصمم لمعالجة النتائج التي تم الحصول عليها من الاختبار.

تم تحليل النتائج إحصائيا باستخدام اختبار (T-test) لإيجاد الفرو قات المعنوية بين معدلات التلوث بسموم الأفلا M_1عند مستوى ($P<0.05$) (15).

النتائج

أوضحت نتائج الكشف عن سم الافلا M_1 في عينات القيمر المصنعة من حليب الجاموس الخام والبالغ عددها ٣٠ عينة، أن عينات القيمر المصنعة من حليب الجاموس الخام كانت تحوي على نسبة ١٠% عينات سالبة لسم الافلا M_1 في حين ٩٠% من عينات القيمر المصنع كانت موجبة لسم الافلا M_1 حيث كان تركيز السم في تلك العينات بمعدل ١٦,١٦٤ نانوغرام /كغم وبمدى تلوث (٥,٠٢٨-٥١,٧٩٤) نانوغرام /كغم. وقد بينت نتائج توزيع سم الافلا M_1 في القيمر المصنع أن ٩٦,٧% من العينات واقعة ضمن الحدود المسموح بها.

أظهرت نتائج الدراسة وجود تلوث أعلى بسم الافلا M_1 في القيمر المحلي مما هو عليه في القيمر المصنع حيث بلغت العينات الموجبة ٢٠ عينة للقيمر المحلي أي بنسبة ١٠٠% وبمعدل ٢٩,١٥٨ نانوغرام /كغم وبمدى تلوث (٨,٨٤٣-٧٢,٠٤٠) نانوغرام /كغم وقد بينت نتائج توزيع سم الافلا M_1 في القيمر المحلي أن ٨٥% من العينات واقعة ضمن الحدود المسموح بها. وقد أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن هناك فروقات معنوية عند مستوى ($P<0.05$) في معدل التلوث بسم الافلا M_1 لكل من القيمر المحلي والقيمر المصنع الجدول (١).

الجدول (١) نسبة تواجد سم الافلا M1 في القيمر المصنع والقيمر المحلي.

العينة	عدد العينات المفحوصة	العينات الموجبة لسم الأفلا M_1		المعدل ± الخطأ القياسي نانوغرام/كغم
		عدد العينات	النسبة المئوية	
القيمر المحلي	٢٠	٢٠	%١٠٠	٢٩,١٥٨ [a] ± ٤,٠٧٦
القيمر المصنع	٣٠	٢٧	%٩٠	١٦,١٦٤ [b] ± ٢,٣٨٣

الأحرف المختلفة تشير إلى وجود فرق معنوي عند مستوى ($P<0.05$).

المناقشة

يتواجد سم الافلا M_1 بشكل رئيس في الجزء السائل من الحليب او يرتبط بجزيئات كازين الحليب إلا أن هناك العديد من من سم الافلا M_1 الموجود في الحليب قد ينتقل إلى القشدة (16). حيث أظهرت نتائج الدراسة للكشف عن سم الافلا M_1 في القيمر المصنع والقيمر المحلي ان القيمر المحلي قد سجل ارتفاعا معنويا عند مستوى ($P<0.05$) في معدل تلوثه بسم الافلا M_1 مقارنة بالقيمر المصنع من الحليب الخام الجدول (١) و كانت نسبة تواجد سم الافلا M_1 في القيمر المصنع ٩٠% في حين كانت نسبة تواجد سم الافلا M_1 في القيمر المحلي ١٠٠% وقد يعزى ارتفاع التلوث بسم الافلا M_1 في القيمر المحلي إلى عدم إتباع الشروط الصحية لتصنيع القيمر او عند تصنيع القيمر يتم جمع الحليب الخام من عدة مناطق وتكون بعض المناطق تحوي تركيز أعلى من سم الافلا M_1 ويتم خلطها قبل التصنيع لذلك يرتفع مستوى سم الافلا M_1 في الحليب الخام وبالتالي ارتفاع نسبة سم الافلا M_1 في القيمر. وفي دراسة قام بها (17) أن معدل سم الافلا M_1 في عينات القشدة كان ٠,٠٢٨ مايكروغرام/ كغم والتي اتفقت مع نتائج دراستنا حيث كان معدل تلوث القيمر المحلي بسم الافلا M_1 ٠,٠٢٩ مايكروغرام/ كغم في حين كان معدل تلوث القيمر المصنع ٠,٠١٦مايكروغرام/ كغم وهي اقل من النتائج السابقة. وكذلك اتفقت النتائج مع ما وجده (18)، واقل من النتائج التي قام بها (19). ولم تتفق النتائج مع ما أشار إليه (20) أن صناعة القشدة المنتجة من حليب ملوث بسم الافلا M_1 كانت حاوية على نسبة ٣٢% فقط من إجمالي السم الموجود أصلا في الحليب الخام الذي صنعت منه.

شكر وتقدير

تم دعم البحث من قبل كلية الطب البيطري /جامعة الموصل.

المصادر

1. Waring R H. Molecules of death. Imperial College Press.2nd edition. 2002; 127-133.
2. Tekinşen KK , Tekinşen O C. Aflatoxin M_1 in white pickle and Van otlu (Herb) cheeses consumed in southeastern in Turkey. Food Control. 2005;16 (7) : 565–568.
3. Creepy EE. Update of survey regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxico Letters.2002; 127: 19–28.
4. Galvano F, Galofaro V, Ritieni A, Bognanno M, De Angelis A, Galvano G. Survey of the occurrence of aflatoxin M_1 in dairy products marketed in Italy: second year of observation. Food Addi Contaminants. 2001; 18 (7) : 644–646.
5. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly C M , Aggarwal D. Am J Clin Nutr. 2004; 80: 1106.
6. Park DL, Njapau H, Boutrif E. Minimizing risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP concepts. Food Nutr Agric. 1999;23: 49–56.
7. Henry SH, Whitaker T, Rabbani I, Bowers J, Park D, Price W, Bosch FX, Pennington J, Verger P, Yoshizawa T, Van Egmond H, Jonker MA, Coker R. In safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. WHO Food Additives Series 47. FAO Food Nutri Paper. 2001; 74: 1-102.
8. Belgin M, Ozlem K, HalukcelikT. Detection of aflatoxin M_1 in cheese samples by ELISA. Food Control J. 2004; 15 (1) : 45-49.

9. Food and Agriculture Organization FAO. Worldwide regulations for mycotoxins 1995. A compendium. FAO Food Nutri Paper. 1997; 43-64.
10. Codex Alimentarius Commission. Comments submitted on the draft Maximum level for Aflatoxin M_1 in milk. Codex Committee on food additives and contaminants. 33rd session, Hague, Netherlands.Compliance Policy Guides.FDA. 2001; 219.
11. European Commission EC. No 1881/2006 of 19 December 2006. Official j Europ Union.2006;L364:5-24.
12. Thirumala-Devi K, Mayo MA, Hall A J, Craufurd P Q, Wheeler T R, Waliyar F, Subrahmanyam A, Reddy DVR. Development and application of an indirect competitive enzyme linked immunoassay for aflatoxin M_1 in milk and milk-based confectionary. Agric J Food Chem. 2002; 50:933–937.
13. Tajkarimi M, Aliabadi-Sh F, Salah N M, Poursoltani H, Motallebi AA, Mahdavi H. Seasonal study of aflatoxin M_1 contamination in milk in five regions in Iran. Int J Food Micro. 2007;116 (3) : 346–349.
14. Baqir AW, Munir MA. Microbiological study on local thick cream (Gaymar) retailed in Basrah. The Arab Gulf. 1980; 12 (12) :131.
15. Petrie A, Watson P. Statistics for veterinary and animal science. Blackwell Science, London. 2003.
16. Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L , Laporta M, Piva G. On the occurrence of aflatoxin M_1 in milk and dairy products. Food Chemi Toxico. 2008 ;16 (4) : 201-207.
17. Bakirci I. A study on the occurrence of aflatoxin M_1 in milk and milk products produced in Van province of Turkey. Food Control. 2001; 12: 47-51.
18. Van Egmond HP, Paulsch WE, Veringa HA, Schuller PL. The effect of processing on the aflatoxin M_1 content of milk and milk products. Arch Inst Pasteur.1977;3 (4) :381-390.
19. Wiseman DW, Marth EH. Behavior of aflatoxin M_1 in yogurt, buttermilk and kefir. J Food Prot.1983 ;46:115–118.
20. Yousef A E, Marth EH. Stability and degradation of aflatoxin M_1. In: van Egmond, H.P., ed., Mycotoxins in Dairy Products, London, Elsev App Sci.1989; 127–161.