Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2011; 14(55): 1-9

Detecting the participating genes in aflatoxin production in suspected eggs for their primary screening

Erami M[1], Saffari M[2*], Pourbakhsh SA[3], Hashemi S J[4]

1- Beheshti Hospital, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
2- Department of Microbiology, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
3- Department of Poultry Research, Razi Institue of Karaj, Karaj, Iran
4- Department of Mycology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received 18 Jul 2010, Accepted 15 Sep 2010

Abstract

***Background*:** Food contamination with fungi and the production of mycotoxins, such as aflatoxin, allow the toxins to enter human body. Continuous contamination with low doses of these agents can act as a major risk factor for hepatocellular carcinoma. Thus the present study was carried out to evaluate the detection of contamination in eggs with aflatoxin by PCR method.

***Materials and Methods*:** In a cross-sectional study, a total of 144 suspicious and 211 intake eggs were collected and three samples of fungi including aspergillus niger, penicillium expansum, and fusarium verticillioides as negative controls and 14 samples of aspergillus flavus as positive controls were selected and examined using TLC and PCR. The results were analyzed through SPSS software.

Results: By PCR, neither aflR, omt-A, and ver-1, nor-1 was detected in intake eggs by PCR. Of the suspected eggs, four samples with nor-1, two samples with aflR, and two samples with omt-A could be detected. Three samples of the 14 strains of aspergillus flavus were shown to be positive through the use of TLC and the four primers. One strain of aspergillus flavus was positive with all of the four primers; however, it was negative in TLC.

***Conclusion*:** The findings of this study indicated that PCR is a sensitive, fast, and specialized technique, but it cannot detect the presence of the fungi before the appearance of colonization. Thus for indicating toxcification, other complementary tests are also required.

***Keywords*:** Aflatoxin, Aspergillas, Egg, Fusarium, Penicillium

*Corresponding author:
Address: Department of Microbiology, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
Email: saffarimahmod@yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 14، شماره2 (شماره پیاپی 55)، خرداد و تیر1390، 9-1

ردیابی ژنهای مشارکت کننده در تولید آفلاتوکسین در تخم مرغ‌های مشکوک به آلودگی جهت غربالگری اولیه آنها

مه زاد ارمی[1]، دکتر محمود صفاری[2*]، دکتر سید علی پوربخش[3]، دکتر سید جمال هاشمی[4]

1- کارشناس ارشد قارچ شناسی، آزمایشگاه بیمارستان شهید بهشتی دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
2- دانشیار، دکترای تخصصی میکروب شناسی،گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
3- استادیار، دکترای تخصصی میکروب شناسی، بخش تحقیقات طیور، انستیتو رازی کرج، کرج، ایران
4- استادیار، دکترای تخصصی قارچ شناسی، گروه قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت 27 /4 /89 ، تاریخ پذیرش89/6/24

چکیده

زمینه و هدف: آلودگی مواد غذایی با قارچها و تولید مایکوتوکسین‌هایی نظیر آفلاتوکسین منجر به ورود این سموم به بدن انسان می‌شود. آلودگی تدریجی با دوزهای ضعیف این مواد می‌تواند به عنوان فاکتورهای خطرناک عمده در ابتلا به سرطان کبد نقش داشته باشد. لذا این تحقیق به منظور ارزیابی تشخیص آلودگی تخم مرغ‌های مصرفی در انسان جهت تشخیص سم آفلاتوکسین به کار گرفته شد.

مواد و روش‌ها:دراین مطالعه مقطعی، 144 تخم مرغ مشکوک و 211 تخم مرغ سالم جمع‌آوری و سه نمونه قارچ آسپرژیلوس نیجر، پنی سیلیوم اکسپانسوم و فوزاریوم ورتیسیلوئیدس به عنوان کنترل منفی و 14 نمونه آسپرژیلوس فلاووس به عنوان کنترل مثبت انتخاب و با تکنیک کروماتوگرافی نازک لایه و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها: در تخم مرغ‌های سالم هیچ یک از ردیف‌های ژن‌های مربوط به پرایمرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز وجود نداشت. در تخم مرغ‌های مشکوک، در 4 نمونه nor-1 ، در 2 نمونه aflR، در 2 نمونه omt-A قابل ردیابی بود. 3 نمونه از 14 سویه اخذ شده آسپرژیلوس فلاووس، با روش کروماتوگرافی نازک لایه و هر 4 پرایمر مثبت بود. یکی از سویه‌های اخذ شده فقط با هر 4 پرایمر در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مثبت بود ولی در روش کروماتوگرافی نازک لایه منفی بود.

نتیجه‌گیری: نتایج فوق نشان می‌دهد که علی رغم این که روش واکنش زنجیرهای پلیمراز یک روش حساس، سریع و اختصاصی می‌باشد و وجود قارچ را قبل از ظهور کلنی در نمونه می‌تواند ردیابی کند، لذا برای اثبات توکسین زایی نیاز به آزمایشات مکمل دیگر دارد.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین، آسپرژیلوس، تخم مرغ، فوزاریوم، پنی سیلیوم

***نویسنده مسئول:** کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، گروه میکروب شناسی

Email: saffarimahmod@yahoo.com

مقدمه

اهمیت غذایی، سلامت انسان و بهداشت مواد مصرفی ازجمله پارامترهایی هستند که در ذخیره سازی مواد غذایی مد نظر می‌باشند(1). رشد قارچ‌ها در مواد غذایی ذخیره شده، یکی از عوامل مهم تهدید کننده سلامتی انسان به شمار می‌روند(4-2)، یکی از منابع غذایی مهم تخم، مرغ است که توسط مردم جهان و صنایع غذایی در سطح زیادی مورد استفاده قرار می‌گیرد و برای تمام سنین توصیه می‌شود(5، 6).

هر چند محتویات داخلی تخم مرغ‌های مصرفی استریل است اما پوسته آنها می‌تواند به سرعت در معرض آلودگی عوامل مختلفی قرار بگیرد(7). آلودگی تخم مرغ در اثر رشد کپک و نفوذ به آلبومین همراه با ترشح آنزیم‌های لیپولیتیک و پروتئولیتیک باعث ایجاد بوهای نامطبوع می‌گردد(8).

آفلاتوکسین یکی از متابولیت‌های قارچی است که توسط آسپرژیلوس فلاووس و پارازیتیکوس تولید و اثرات کارسینوژنیک، تراتوژنیک و توکسیک این سم به اثبات رسیده است(9). این ماده باعث تخریب DNA ، موتاسیون ژن‌ها، آنومالی کروموزومی و تغییرات سلولی در سلول‌های پستانداران می‌گردد(10).

وجود این ماده در تخم مرغ و مصرف آن به خصوص در بچه‌های در حال رشد، به عنوان یک عامل بالقوه در ایجاد سرطان در سنین بالاتر ممکن است نقش داشته باشد و بسیاری از کشورها سیستم پایش منظمی در این مورد دارند(7).

با عنایت به اهمیت این توکسین و خسارت اقتصادی آن، بر آن شدیم تا وجود آفلاتوکسین را از طریق ردیابی قارچ‌های مولد در تخم مرغ با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بررسی نمائیم. جهت استاندارد نمودن روش کار نیز از روش استاندارد طلایی کروماتوگرافی نازک لایه (TLC) با استفاده از سوش‌های مثبت استفاده شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت مقطعی و انتخاب نمونه به روش تصادفی بود، 144 عدد تخم مرغ مشکوک (دارای ظاهر طبیعی اما لکه‌دار و ترک دار و ...)و 211 تخم مرغ سالم (ظاهری سالم و فاقد لکه و سوراخ) از مغازه‌ها انتخاب شدند. از تخم مرغ‌های مشکوک با سرنگ استریل نمونه‌گیری و جهت تشخیص از روش‌های مولکولی و مایکولوژی بهره گرفته شد. در تخم مرغ‌های سالم فقط روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد. جهت بررسی 2 میلی‌لیتر نمونه به 5 میلی‌لیتر محیط مایع عصاره مغز و قلب و محیط سابورودکستروزآگار منتقل و پس از 24 ساعت در دمای 30- 28 درجه سانتی‌گراد مقدار 1 میلی‌لیتر محیط مایع عصاره مغز و قلب رابه میکروتیوب جهت بررسی‌های مولکولی منتقل کردیم. همزمان بررسی‌های قارچ شناسی در محیط کشت نیز انجام گرفت.

جهت فراهم نمودن نمونه کنترل مثبت، 14 سویه آسپرژیلوس فلاووس از دانشکده بهداشت دانشگاه تهران تهیه شد. این سوش‌ها با روش کروماتوگرافی نازک لایه جهت تولید آفلاتوکسین مورد آزمایش قرار گرفتند. سوش‌های کنترل منفی نیز از گونه‌های آسپرژیلوس و پنی سیلیوم و فوزاریوم انتخاب شدند.

جهت اثبات تولید و یا عدم تولید آفلاتوکسین در سوش‌های کنترل، از روش کروماتوگرافی نازک لایه استفاده شد. به طور خلاصه، قارچ‌ها روی محیط سابورودکستروزآگار رشد داده شد و به محیط کشت آسپرژیلوس فلاووس آسپرژیلوس پارازیتیکوس (AFAP) یا محیط آفلاتوکسین پرو دیوسینگ ابیلیتی (APA) استریل پاساژو در دمای30- 28 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از 72 - 48 ساعت، کلنی‌ها در آب مقطر حل و در 10 میلی‌لیتر کلروفورم عصاره‌گیری و در 1500 دور به مدت 15 دقیقه در سانتریفوژ یخچال دار سانتریفوژ گردید و فاز کلروفرمی (لایه زیرین) پس از جداسازی، با دستگاه تقطیر در خلاء 2000 wb تغلیظ گردید. لکه گذاری روی صفحات کروماتوگرافی نازک لایه به ابعاد20 × 20 حاوی

سیلیکاژل 60 (شرکت مرک) انجام و در حلال‌های متعدد (کلروفرم + استن + آب، کلروفرم + استن + ایزوپروپانول، کلروفرم + متانول + اسیداستیک ، تولوئن + ایزوآمیل الکل + متانول) انجام شد. مقایسه نتایج نشان داد که استفاده از حلال گروه چهارم (تولوئن + ایزوآمیل الکل + متانول به نسبت 90 : 32 : 3) به دلیل سرعت حرکت بیشتر و زمان کوتاهتر مناسب‌تر است.

بعد از 1 الی 1/5 ساعت، صفحات کروماتوگرافی نازک لایه را بیرون آورده و خشک نموده و با استفاده از اسید سولفوریک 25 درصد و نور ماورا بنفش تشخیص دادیم. سویه‌های استاندارد مثبت و منفی و سویه‌های ایزوله شده از کشت تخم مرغ‌های مشکوک با روش فوق تحت مطالعه قرار گرفتند.

جهت تخلیص DNA ، قارچ‌های مورد مطالعه (مثبت، منفی و نمونه‌های مورد) در محیط مایع عصاره مغز و قلب کشت و بعد از 48 ساعت توده‌های قارچی رشد کرده را هموژن نموده و 1 میلی‌لیتر از هر یک از نمونه‌ها را در 5000 دور در دقیقه سانتریفوژواز 100 میکرو لیتر آن جهت استخراج DNA استفاده کردیم.

برای این منظور، هم حجم آن را بافر لیزکننده اضافه کرده و بعد از شیکر، 4 ساعت در دمای 56 درجه سانتی‌گراد قرار داده وبه هم حجم آن، فنل اشباع اضافه نموده و در 13000 دور در دقیقه به مدت بیست دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی را تحت تاثیر محلول فنل و کلروفرم قرار داده و در 13000 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه سانتریفوژ شد. فاز آبی بالایی جدا و هم حجم آن کلروفرم اضافه و 5 دقیقه در 13000 دور در دقیقه سانتریفوژ شد. جهت حذف املاح و تغلیظ DNA ، نمونه را با استات سدیم تیمارنموده و به آن اتانل مطلق اضافه کرده و 20 دقیقه در 13000 دور در دقیقه سانتریفوژ و DNA را با الکل اتانل 70 درصد شسته و بعد از خارج کردن الکل، نمونه DNA خشک شد. در مرحله بعد آن را در آب مقطر حل کرده و در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت تعیین غلظت DNA ، با استفاده از دستگاه نانودراپ با روش اسپکتروفتومتری در طول موج 260 نانومتر غلظت DNA تعیین گردید. نمونه‌های شاهد مثبت در این روش معادل 56/9 نانوگرم در میلی‌لیتر DNA داشت.

تخلیص DNA تخم مرغ نیز با استفاده از روش فوق الذکر انجام گردید و جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تا زمان استفاده در دمای 20– درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جهت انتخاب پرایمرها از سه ژن ساختمانی 1 nor-، Ver-1 و omt-A و یک ژن تنظیمی aflR استفاده شد. سکانس پرایمرها به شرح ذیل است:

1)nor-1: 5′-ACC GCT CCG GCA CTC TCG GCAC-3′
5′-GTT GGC CGC CAG CTT CGA CAC TCCG-3′

این پرایمر قطعه 400 جفت باز از نوکلئوتید 901-501 ژن nor-1 از A. Parasiticus را در بر می‌گیرد.

2) Ver-1: 5′- ATG TCG GAT AAT CAC CGT TTA GAT CGC-3′
5′- CGA AAA GCG CCA CCA TCC ACC CCA ATG-3′

این پرایمر قطعه 895 جفت باز از نوکلئوتید 1391-496 ژن ver-1 در A.parasiticus سویه NRR L5862 را در بر می‌گیرد.

3) omt-A: 5′- GGC CCG GTT CCT TGG CTC CTA AGC – 3′
5′- CGC CCC AGT GAG ACC TTG CTC G-3′

این پرایمر قطعه 1200 جفت باز از نوکلئوتید 1431-231 ژن omt-1 در A. parasiticus سویه SRRC143 را در بر می‌گیرد.

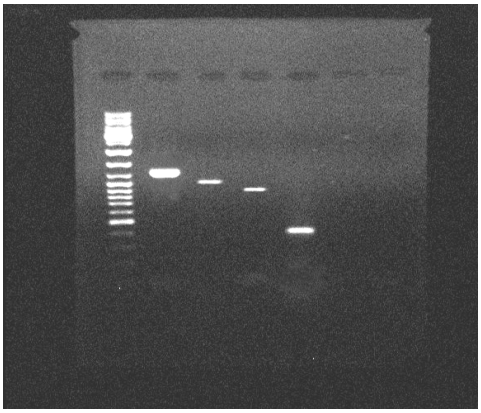
4) aflR: 5′- TAT CTC CCC CCG GGC ATC TCC CGG – 3′
5′- CCG TCA GAC AGC CAC TGG ACA CGG – 3′

این پرایمر قطعه 1032 جفت باز از نوکلئوتید 1482-450 ژن aflR در A. Parasiticus را در بر می‌گیرد.

برای انجام آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، 2/5 میکرو لیتر بافر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز x 10، 0/75 میکرولیتر 2 کلرید منیزیوم، 0/5 میکرو لیتر مخلوط

نوکلئوتید فسفات، 0/625 میکرولیتر پرایمر R ، 0/625 میکرولیتر پرایمر F ، 0/5 میکرو لیتر آنزیم Taq DNA پلیمراز، 2 میکرو لیتر نمونه DNA و 17/5 میکرولیتر آب مقطر با هم مخلوط شد و 25 میکرولیتر مخلوط اصلی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ازهریک از نمونه‌ها تهیه شد.

جهت پرایمرهای 1 ، 2و 3 ، مرحله واسرشتDenaturation) در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، مرحله اتصال (annealing) در دمای 65 درجه سانتی‌گراد یک دقیقه و مرحله ساخت(Polymeuzation) در دمای 72 درجه سانتی‌گراد یک دقیقه به تعداد 35 سیکل و ساخت پایانی در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انجام شد. جهت پرایمر شماره 4، مرحله واسرشت در دمای 94 درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، مرحله اتصال در دمای 65 درجه سانتی‌گراد دو دقیقه و مرحله ساخت در دمای 72 درجه سانتی‌گراد، به مدت دو دقیقه به تعداد 35 سیکل و ساخت پایانی در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انجام شد. جهت بررسی بیشتر وجود ژن aflR ، 14 سویه شاهد در محیط پتیتودکستروزآگار، غنی سازی شده و پس از استخراج DNA ، با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز وجود ژن فوق مورد ردیابی مجدد قرار گرفت.



شکل 1. آنالیز ژل الکتروفورزیس محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای استفاده شده در نمونه کنترل مثبت از چپ به راست:مارکر مولکولی ، (Nor-1(400bp Ver-1(895 bp)، (afIR(1032 bp) ، Omt-1(1200 bp)

محصولات به دست آمده نسبت 2 به 10 با فرلودینگ 6x ترکیب و در 100 وات و 50 آمپر یک ساعت الکتروفورز و با دستگاه ماورا بنفش ترانس ایلومینیاتور خوانده شد و نتایج تجزیه و تحلیل گردید.

نتایج به دست آمده از روش‌های فوق ثبت و با استفاده از روش‌های آماری SPSS تجزیه و تحلیل گردید.

یافته ها

نتایج مطالعه روی تخم مرغ‌های مشکوک نشان داد که در 12 مورد قارچ رشد نمودند که 7 مورد آسپرژیلوس، یک مورد موکور، دو مورد پنی سیلیوم و 3 مورد دیگر قارچ‌های ساپروفیت بودند. در یک مورد پنی سیلیوم و آسپرژیلوس با هم رشد نمودند.

نتایج مطالعه با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر اساس پرایمرهای مورد استفاده در سوش‌های اخذ شده نشان داد که در مواردی که نتیجه روش کروماتوگرافی نازک لایه مثبت باشد، نتایج تست مولکولی با این پرایمرها نیز مثبت می‌گردد(شکل 1)، ولی ممکن است عکس آن صادق نباشد. آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و روش کروماتوگرافی نازک لایه نمونه‌های شماره 1، 3 و 7 و مقایسه آنها با شماره 9 این را نشان می‌دهد(جدول 1).

بحث

نظارت و کنترل جهت استفاده از مواد غذایی سالم یکی از شاخص‌های توسعه علمی و سلامت اجتماعی هر کشوری محسوب می‌شود(11، 12).

اصولاً تخم مرغ‌های تازه، استریل هستند اما بعد از تولید و بسته‌بندی، میکروارگانیسم‌های متعددی ممکن است سطح آنها را آلوده و در آن نفوذ نموده و باعث آلودگی و فساد آنها شوند(9).آلودگی تخم مرغ با سم آفلاتوکسین از دو راه میسر است: راه اول وجود سم در رژیم و راه دوم آلودگی تخم مرغ بعد از تولید با قارچ‌های مولد سم می‌باشد که عمدتاً به دنبال آسیب و یا خراش و شکستگی پوسته اتفاق می‌افتد(14،13).

جدول1. نتایج مطالعه روی 14 سوش اسپرژیلوس فلاووس اخذ شده از دانشکده بهداشت دانشگاه تهران بعلاوه کنترل مثبت و سوشهای غیر توکسیژنیک ونمونه های تخم مرغ مشکوک

نام ایزوله	نوع پرایمر ها و نتیجه آزمایش زنجیره ای پلیمراز				
	nor-1	ver-1	Omt-A	aflR	نتیجه کروماتوگرافی
۱	+	+	+	+	Positive
۲	+	-	+	-	Negative
۳	+	+	+	+	Positive
٤	+	-	+	+	Negative
٥	-	+	+	-	Negative
٦	-	-	-	+	Negative
۷	+	+	+	+	Positive
۸	-	-	+	-	Negative
۹	+	+	+	+	Negative
۱۰	-	-	+	-	Negative
۱۱	+	+	-	-	Negative
۱۲	-	+	-	-	Negative
۱۳	-	-	-	-	Negative
۱٤	-	-	-	-	Negative
Positive control	+	+	+	+	positive
A.niger	_	_	_	_	Negative
P.expansium	_	_	_	_	Negative
F.verticilloides	_	_	_	_	Negative
1 sample	+	_	_	+	Negative
2 sample	+	_	_	_	Negative
3 sample	+	_	_	_	Negative
4 sample	+	_	+	_	Negative
5 sample	_	_	+	+	Negative

تفسیر نتایج فوق نشان می‌دهد که هر چند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روشی سریع در تشخیص سوش‌های آفلاتوکسیژنیک است اما این تکنیک به تنهایی در افتراق سویه‌های توکسیژنیک از غیر توکسیژنیک کارآیی ندارد ولی علیرغم این نقصان، وجود هر یک از ژن‌های فوق در یک ماده شبیه تخم مرغ، می‌تواند دلیل بر این باشد که به مرور شرایط محیطی در چنین موادی، در جهت تسهیل تولید سم فوق بوده است، لذا وجود این ژن‌ها و اثبات آنها در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، شاید به عنوان شاخصی جهت ارزیابی کیفی ماده غذایی کارآیی لازم را داشته باشد .

به همین منظور در 5 مورد از 144 تخم مرغ مشکوک، نشان داده شد که حداقل یک و حداکثر 2 ژن مؤثر در تولید توکسین فوق قابل رویت است، در صورتی که در تخم مرغ‌های سالم هیچ نشانی از ژن‌های فوق مشاهده نگردید. بر این اساس هر چند وجود باند در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در این موارد دلیل بر وجود سم نیست ولی

می‌تواند در کنترل کیفی به عنوان پارامتری مد نظر قرار گیرد.

گزارش‌های متعددی از شیوع آلودگی با آفلاتوکسین درنقاط مختلف جهان وجود دارد. این گزارش‌ها نه تنها از جنبه مسمومیت بلکه از نظر ایجاد سرطان کبد، کواشیورکور و اختلال در رشد کودکان را نیز مدنظر داشته است .آلودگی کارگران و بیماران متعدد با این سم در نپال گزارش گردیده است. در نپال علاوه برآسپرژیلویس، گونه‌هایی از فوزاریوم نیز در ایجاد این سم دخالت داشته‌اند که باعث آلودگی دانه حبوبات گردیده است. آلودگی دانه‌های ذرت، گندم و برنج از جمله مشکلاتی است که در ذخیره سازی این مواد گزارش گردیده است(11). گزارش اپیدمی دهه 1970 در انگلیس در خصوص اپیدمی بیماری تب بدخیم ناشی از مواد فاسد شده و تب عصبی آرام نیز که منجر به مرگ دو کودک گردید، از جمله مواردی است که منجر به اصلاح روش‌های نگهداری مواد غذایی در انگلیس گردید(1).

مطالعات دیگر روی تخم بلدرچین نشان داد که آلودگی تخم بلدرچین ممکن است نتیجه بقاء سم در روده و ورود آن هنگام تشکیل تخم باشد، که این فرایند حتی در غلظت‌های پایین نیز ممکن است اتفاق بیافتد. این روش آلودگی نیز در تخم مرغ مد نظرمی‌باشد که آلودگی خوراک مورد مصرف مرغ‌ها نیز از این نظر نباید مخفی بماند(15).

آلودگی با این سم در سایر نمونه‌های غذایی در کشورهای پیشرفته مدنظر می‌باشد. برای مثال در ایتالیا در تحقیقی در سال اخیر نشان دادکه حتی از نمونه‌های غذایی مورد مصرف کودکان در سوپرمارکت‌ها آلودگی وجود دارد هر چند سطح این آلودگی پایین‌تر از حدود استاندارد مصوب اروپا یعنی کمتر از 25 نانوگرم در لیتر بوده است. ولی نکته این که کنترل مداوم و نظارت مستمر برتولید و عرضه مواد غذایی از جمله برنامه‌های بسیاربا اهمیتی است که بایستی همیشه مدنظر باشد و استمرار آن حتی در کشورهای پیشرفته از نظر دور نمی‌ماند(16).

آلودگی با مواد غذایی دیگر نظیر شیر حیوانات ممکن است اتفاق بیافتد. مطالعه ایی که در اهواز انجام گرفته نشان داد هر چند میزان این سم کمتر از سطح استاندارد مورد قبول در ایران بوده است (500 نانوگرم در لیتر) اما در 8 درصد از نمونه‌های شیر میزان آن بالاتر از سطح قابل قبول مورد تأییداتحادیه اروپا بوده است(12). تحقیقی در ترکیه نیز روی شیر مادران از نظر آلودگی با این سم صورت گرفته که نشان داده است که استمرار تماس مادران و نوزادان با این سم لزوم توجه بیشتر به اهمیت این سم و آلودگی مایعات بیولوژیکی مورد مصرف انسان را بیان می‌کند(17).

مطالعات صورت گرفته در مصر نشان دادکه کنترل و پایش آلودگی خوراک مرغ‌ها از اهمیت بسیاری برخوردار است. به خصوص از این نظر که حرارت دادن تخم‌مرغ جهت مصرف هرچند باعث آلودگی‌زدایی میکروب‌هایی نظیر سالمونلا می‌گردد، ولی در سم زدایی آفلاتوکسین کمتر تأثیر دارد، بنابراین به نظر می‌رسد که تنها راه جلوگیری از انتقال سم از راه تخم‌مرغ، جلوگیری از آلودگی آن باشد(10). امروزه محققین برآنند که از خوارک‌هایی برای مرغ‌ها استفاده شود که این خوارک‌ها باعث جذب سم شده و از ورود سم به بدن مرغ یا واردشدن آن به تخم‌مرغ جلوگیری شود(14).

جهت ارزیابی تست واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و اهمیت شناسایی ژن‌های مورد مطالعه و در مقایسه با سوش‌های استاندارد اخذ شده از دانشکده بهداشت دانشگاه تهران، نتایج نشان داد وجود هر چهار ژن مورد مطالعه در روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شرط لازم برای مثبت شدن روش کروماتوگرافی نازک لایه به عنوان استاندارد طلایی می‌باشد. ژن‌های Nor-1 و Ver-1 و Omt-A سه ژن ساختمانی هستند که در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین عمل نموده و در تولید آنزیم‌های کلیدی برای تولید آفلاتوکسین ضروری هستند(18).

در این مطالعه، جهت استخراج DNA از روش فنل وکلروفرم استفاده شد که با توجه به حذف عوامل

مداخله گر مثل پروتئین‌ها و سایر ذرات، روش قابل اعتمادتری می‌باشد(19، 20). همچنین در مطالعات دیگر نشان دادند که تنظیم بیوسنتز آفلاتوکسین در قارچ‌های خانواده آسپرژیلوس، با مداخله فاکتورهای تنظیم کننده رونویسی متعدد مثبت و منفی صورت می‌گیرد که این فاکتور ممکن است تحت تاثیر پارامترهای محیطی و غذایی قرار داشته باشد(23-21).

مطالعات گیزن نشان داد که فقدان افلاتوکسین می‌تواند در اثر موتاسیون جانشینی بعضی از بازها اتفاق بیافتد و لیو و چو نشان دادند که تغییر شرایط فیزیولوژیکی در بیوسنتز افلاتوکسین اثر بسزایی دارد(20، 24). سوانی ومایر نشان دادند که وجود یا عدم وجود RNA پیامبر می‌تواند در افتراق مستقیم سویه‌های توکسیژنیک و غیر توکسیژنیک مثمر ثمر باشد(25، 26).

از طرف دیگر به نظر می‌رسد در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین یکسری ژن تنظیم کننده وجود دارد که اینها روی ژن‌های ساختمانی تاثیر گذارده و باعث فعال سازی نسخه‌برداری در آنها می‌شود. در صورت عدم وجود این ژنها قارچ قادر به تولید سم نخواهد بود.

نتیجه گیری

با توجه به پیچیدگی فرآیند تولید سم و فقدان روش مولکولی سریع در تشخیص قطعی وجود سم، به نظر می‌رسد که روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در غربال اولیه کمک کننده است و در صورت مثبت شدن نتیجه، استفاده از سایر روش‌های دقیق‌تر توصیه شود. به نظر می‌رسد بسط این روش غربالگری در مواد غذایی نیاز به تحقیق و بررسی بیشتر دارد و طراحی روشی سریع با حساسیت و ویژگی بالا جهت تائید قطعی آلودگی نهایی با آفلاتوکسین لازم و ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از کلیه دوستان و همکارانی که درانجام این تحقیق ما را یاری نموده‌اند به خصوص از رئیس محترم بخش بیماری‌های طیور موسسه رازی، دانشکده بهداشت دانشگاه تهران بخش قارچ شناسی و همچنین معاونت پژوهشی موسسه رازی به عنوان تامین کننده مالی تقدیر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

1. Meggs WJ. Epidemics of mold poisoning past and present. Toxicol Ind Health. 2009 Oct-Nov;25(9-10): 571-6.
2. Celik TH, Sar mehmeto lu B, Küplülü Ö. Aflatoxin M1 contamination in pasteurised milk. Veterinarski Arhiv. 2005;75(1):57-65.
3. Kovács M. Nutritional health aspects of mycotoxins. Orv Hetil. 2004 Aug;145(34):1739-46.
4. Partanen HA, El-Nezami HS, Leppänen JM, Myllynen PK, Woodhouse HJ, Vähäkangas KH. Aflatoxin B1 transfer and metabolism in human placenta. Toxicological Sciences. 2010;113(1):216.
5. Herranz S, Moreno-Bondi MC, Marazuela MD. Development of a new sample pretreatment procedure based on pressurized liquid extraction for the determination of fluoroquinolone residues in table eggs. J Chromatogr A. 2007 Jan;1140(1-2):63-70.
6. Altuntas E, Sekeroglu A. Effect of egg shape index on mechanical properties of chicken eggs. Journal of Food Engineering. 2008;85(4):606-12.
7. WHO. International health regulations (2005): World Health Organization; 2008.
8. Board R. The avian eggshell:A resistance network. Journal of Applied Microbiology. 1980;48(2):303-13.
9. Salem R, El-Kaseh R, El-Diasty E. A study on the fungal contamination and prevalence of aflatoxins and some antibiotic residues in table eggs. Arab Journal of Biotechnology. 2009;12(1):65-71.
10. FAO.Aflatoxin contamination in foods and feeds in the philippines. FAO/WHO Regional Conference on Food Safety for Asia and Pacific; Seremban, Malaysia2004. p. 24-7.
11. Koirala P, Kumar S, Yadav BK, Premarajan KC. Occurrence of aflatoxin in some of the food and feed in Nepal. Indian J Med Sci. 2005 Aug;59(8):331-6.

12.Rahimi E, Bonyadian M, Rafei M, Kazemeini HR. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. Food Chem Toxicol. 2010 Jan; 48(1): 129-31.
13.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 Journal of Nutrition. 2009;8(2):181-6.
14. Dhama K, Chauhan R, Mahendran M, Singh K, Telang A, Singhal L, et al. Aflatoxins-hazard to livestock and poultry production: A review. Journal of Immunology and Immunopathology. 2007;9(1&2):1-15.
15.Yu J, Chang PK, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, et al. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. Appl Environ Microbiol. 2004 Mar; 70(3):1253-62.
16. Chen RS, Tsay JG, Huang YF, Chiou RY. Polymerase chain reaction-mediated characterization of molds belonging to the Aspergillus flavus group and detection of Aspergillus parasiticus in peanut kernels by a multiplex polymerase chain reaction. J Food Prot. 2002 May;65(5):840-4.
17. Oliveira CA, Rosmaninho JF, Castro AL, Butkeraitis P, Reis TA, Corrêa B. Aflatoxin residues in eggs of laying Japanese quail after long-term administration of rations containing low levels of aflatoxin B1. Food Addit Contam. 2003 Jul; 20(7):648-53.
18. Geisen R. A multiplex PCR reaction for the detection of aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. Syst Appl Microbiol. 1996;19:388-92.
19. Ehrlich KC, Montalbano BG, Cotty PJ. Sequence comparison of aflR from different Aspergillus species provides evidence for variability in regulation of aflatoxin production. Fungal Genet Biol. 2003 Feb;38(1):63-74
20. Cary JW, Dyer JM, Ehrlich KC, Wright MS, Liang SH, Linz JE. Molecular and functional characterization of a second copy of the aflatoxin regulatory gene, aflR-2, from Aspergillus parasiticus. Biochim Biophys Acta. 2002 Jul;1576(3):316-23.
21. Gürbay A, Sabuncuoğlu SA, Girgin G, Sahin G, Yiğit S, Yurdakök M, et al. Exposure of newborns to aflatoxin M1 and B1 from mothers' breast milk in Ankara, Turkey. Food Chem Toxicol. 2010 Jan;48(1):314-9.
22. Takahashi T, Chang PK, Matsushima K, Yu J, Abe K, Bhatnagar D, et al. Nonfunctionality of Aspergillus sojae aflR in a strain of Aspergillus parasiticus with a disrupted aflR gene. Appl Environ Microbiol. 2002 Aug;68(8):3737-43.
23. Meucci V, Razzuoli E, Soldani G, Massart F. Mycotoxin detection in infant formula milks in Italy. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2010 Jan;27(1):64-71.
24. Liu BH, Chu FS. Regulation of aflR and its product, AflR, associated with aflatoxin biosynthesis. Appl Environ Microbiol. 1998 Oct;64(10):3718-23.
25. Sweeney MJ, Pàmies P, Dobson AD. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for monitoring aflatoxin production in Aspergillus parasiticus 439. Int J Food Microbiol. 2000 May;56(1):97-103.
26. Mayer Z, Färber P, Geisen R. Monitoring the production of aflatoxin B1 in wheat by measuring the concentration of nor-1 mRNA. Appl Environ Microbiol. 2003 Feb; 69(2): 1154-8.