نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره هجدهم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۱،
پیاپی ۴۵ :۸۷-۷۵

JVM Journal of Veterinary Microbiology

مقاله کاربردی

بررسی وجود آفلاتوکسین B1 در غذای خشک سگ و گربه عرضه‌شده در استان اصفهان به روش الایزا

پرتو رئیسی دهکردی[1] ،پیمان کیهانی[2*] ،ابراهیم رحیمی[3]

۱-دانش آموخته ی دکترای دامپزشکی،دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد ، شهرکرد ، ایران

2-استادیار گروه علوم درمانگاهی ،دانشکده دامپزشکی ،دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد ،شهرکرد ،ایران

۳-استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد ،شهرکرد ،ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۷

چکیده

آفلاتوکسین‌ها سموم طبیعی می‌باشند که انواع مختلفی از غذای انسان و حیوانات را آلوده می کنند و باعث تهدید سلامت انسان و دام می گردند. هدف از این مطالعه بررسی وجود افلاتوکسین B1 در غذای خشک سگ و گربه عرضه‌شده در استان اصفهان به روش الایزا بود. بدین منظور با مراجعه با پت‌شاپ‌های شهرستان اصفهان ۴۸ نمونه خوراک سگ از ۱۲ برند و ۴۸ نمونه از ۱۲ برند خوراک گربه جمع‌آوری گردید. از هر برند مقدار ۲۰۰ گرم نمونه یکنواخت شده برداشته و به آزمایشگاه انتقال داده شد و مطابق دستورالعمل کیت آماده تجاری AFB1 شرکت سازنده (Euroclone, Italy) آزمون شد. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که در تمامی نمونه‌های بررسی‌شده حضور آفلاتوکسین B1 با دامنه‌ی غلظت ۲۴ تا ۳۸ نانوگرم بر گرم قابل‌تشخیص بود و تمامی برندها مقدار بالاتری از حد مجاز آفلاتوکسین (۲۰ ng/g) را از خود نشان دادند. در میان برندهای غذای سگ، اختلاف معناداری بین برندهای خارجی و داخلی در میزان افلاتوکسین مشاهده نگردید اما در مقایسه میزان آفلاتوکسین برندهای خارجی و داخلی گربه مشاهده گردید که میزان آن در برندهای داخلی بیشتر از برندهای خارجی می‌باشد. طبق نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه، ازآنجایی که این مایکوتوکسین سلامت حیوانات را متأثر می‌سازد و سبب بروز اختلالات جدی در آن‌ها می گردد و با توجه به اینکه در تمامی برندهای بررسی‌شده در این مطالعه میزان آن از حد مجاز بالاتر بوده است، نظارت دائمی برای آفلاتوکسین B1 توسط صنایع تولیدکننده خوراک سگ و گربه و همچنین کنترل واردات خوراک ضروری به نظر می‌رسد.

واژه های کلیدی: آفلاتوکسین B1، غذای سگ و گربه، الایزا

*نویسنده مسئول : پیمان کیهانی

آدرس: شهرکرد، گروه علوم درمانگاهی ، دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد ،شهرکرد ،ایران

پست الکترونیکی : dr.p.keihani@gmail.com

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها از مهم‌ترین آلاینده‌های سمی مواد غذایی هستند و از متابولیت‌های ثانویه قارچ‌های موجود در محصولات کشاورزی محسوب می‌شود. تاکنون بالغ بر ۵۰۰ مایکوتوکسین مختلف شناخته شده است که در میان انواع مختلف سموم قارچی مختلف، افلاتوکسین‌ها به دلیل اثرات مختلف بیوشیمیایی شامل اثر بر متابولیسم انرژی، اثر بر متابولیسم کربوهیدرات و چربی، اثر بر سنتز پروتئین و اسیدنوکلئیک و اثرات بیولوژیک شامل سرطان‌زایی، جهش‌زایی، ناقص الخلقه‌زایی، ایجاد مسمومیت کبدی، مسمومیت ریوی، مسمومیت پوستی و اثر تضعیف‌کننده بر سیستم ایمنی از جایگاه ویژه‌ای در بهداشت و سلامتی انسان و حیوانات برخوردار هستند. آفلاتوکسین‌ها تقریباً تمام پارامترهای تولیدی ازجمله وزن، ضریب تبدیل غذایی و تولیدمثل را به خطر می‌اندازد (21). این توکسین‌ها عمدتاً توسط گونه‌های مختلف آسپرژیلوس به‌خصوص، *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* تولید می‌شوند. تاکنون ۱۷ نوع آفلاتوکسین در طبیعت تشخیص داده شده است که آفلاتوکسین‌های B1، B2، G1، G2، M1و M2 مهم‌ترین آن‌ها می‌باشند در این میان آفلاتوکسین B1 (AFB1) از همه سمیت بیشتری دارد و جزء مواد سرطان‌زا، جهش‌زا و ناقص الخلقه‌زا محسوب می‌شود. اثرات سمی AFB_1 بسته به گونه، سن، جنس، و رژیم غذایی تغییر می‌کند. سمیت AFB_1 به چگونگی متابولیزه شدن آن در کبد وابسته است (17).

به نظر می‌رسد که آفلاتوکسین‌ها طیف گسترده‌ای از محصولات مهم کشاورزی ازجمله ذرت، گندم، برنج، دانه‌های روغنی، ادویه‌ها، ترشیجات، میوه‌های خشک و آجیل‌ها را آلوده می‌کنند. حضور و رشد قارچ در مواد غذایی می‌تواند در مرحله‌های قبل از برداشت محصول و بعد از برداشت محصول رخ دهد. به‌علاوه وجود دمای بالا و رطوبت شرایط رشد را برای قارچ بهبود می‌بخشند. درنتیجه در مناطقی مثل جنوب شرقی آسیا و مناطق نیمه صحرایی آفریقا شرایط خوبی برای رشد این قارچ فراهم است و به‌علاوه در کشورهایی که در این مناطق هستند و تجهیزات لازم برای ذخیره‌ی غذا در شرایط خشک و با دمای کنترل‌شده را ندارند میزان آلودگی افلاتوکسین B_1 بسیار بالاست (12) .

امروزه در غذای خشک سگ و گربه از موادی ازجمله برنج، انواع میوه‌ها و ذرت نیز همراه با گوشت استفاده می‌شود که احتمال آلودگی هرکدام از این مواد وجود دارد. تحقیقات بسیاری در کشورهای برزیل، هند، پاکستان، چین و کانادا در این رابطه انجام‌شده انجام شده است. در این تحقیقات مشخص شد که به طور میانگین AFB_1 در برنج ۷۳/۲ میکروگرم بر کیلوگرم، در ذرت ۷۳/۱ میکروگرم بر کیلوگرم، در گندم ۳۲/۹ میکروگرم بر کیلوگرم و در میوه‌های خشک‌شده ۱۶/۳ میکروگرم بر کیلوگرم AFB_1 وجود دارد (18).

از منظر کلینیکی اگرچه مقادیر اندک آفلاتوکسین سبب بروز علائم فوری در حیوان نمی‌گردد اما مواجه مزمن با این ماده باید جدی گرفته شود. دیده‌شده مواجه مزمن با این ماده سبب بی‌اشتهایی، بی‌حالی و لخته داخل رگی می‌گردد. همچنین ضایعات کبدی در سگ‌هایی که برای مدت ۶ تا ۸ هفته در معرض ۰/۳ میلی‌گرم از آفلاتوکسین بوده‌اند گزارش‌شده است (6).

در حال حاضر با توجه به اینکه حضور حیوانات خانگی سگ و گربه در خانه زیاد شده و متعاقب ان استفاده از غذای خشک افزایش یافته است این در حالی است که نظارت اندکی بر روی کیفیت آن‌ها وجود دارد لذا مطالعه‌ی حاضر به بررسی میزان غلظت افلاتوکسین B1

در اقلام خوراک خشک سگ و گربه‌ی عرضه‌شده در شهرستان اصفهان می‌پردازد.

مواد و روش ها

- روش نمونه گیری و آماده سازی نمونه ها

نمونه‌های استفاده‌شده در این مطالعه شامل ۴۸ نمونه از ۱۲ برند خوراک سگ و ۴۸ نمونه از ۱۲ برند خوراک گربه بود. لازم به ذکر است برای هر برند خوراک مربوط به هر گونه، ۲ نمونه از ۲ بسته بندی مجزا خوراک با نوع و محتویات یکسان با رعایت شرایط بهداشتی و با استفاده از دستکش و ظروف استریل با مراجعه به پت‌شاپ‌های شهرستان اصفهان جمع‌آوری شده و مورد آزمایش قرار گرفت. از هر برند مقدار ۲۰۰ گرم نمونه یکنواخت شده برداشته و به آزمایشگاه انتقال داده شد. سپس به‌طور کامل در میکسر آسیاب گردید و مطابق دستورالعمل کیت آماده تجاری AFB_1 شرکت سازنده (Euroclone, Italy) آزمون شد.

مقدار ۱۰ گرم از نمونه آسیاب شده درون لوله شیشه‌ای ریخته شد و به آن مقدار ۵۰ میلی‌لیتر محلول متانول ۳۳ درصد افزوده شد. سپس به مدت ۲ دقیقه داخل دستگاه ورتکس گذاشته شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد.در مرحله‌ی بعدی نمونه‌ی مخلوط گردیده فیلتر شد، و محلول فیلتر گردیده به نسبت ۱ به ۲ با متانول ۳۳ درصد مخلوط گردید. محلول بدست امده مجددا با متانول ۳۳ درصد به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق سازی شد و محلول بدست امده برای چاهک‌های کیت الایزا استفاده گردید.

- سنجش میزان آفلاتوکسین با روش الیزا

مطابق دستورالعمل کیت، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از بافر رقیق‌سازی استاندارد در چاهک A1 به‌عنوان کنترل و میزان ۵۰ میکرولیتر از استاندارد صفر در چاهک B1 به‌عنوان حداکثر جذب نوری و میزان ۵۰ میکرولیتر از هر محلول استاندارد آفلاتوکسین B1 (۶ استاندارد) تهیه گردیده به‌وسیله‌ی شرکت سازنده (Euroclonec, Italy) درون چاهک‌های C1 تا H1 ریخته شد. سپس میزان ۵۰ میکرولیتر از هرکدام از نمونه‌های آماده گردیده در مرحله قبل در مابقی چاهک‌ها افزوده گردید. در مرحله‌ی بعد میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنتی‌بادی درون تمامی چاهک‌ها به‌استثنای چاهک شاهد افزوده گردید. میکروپلیت به‌آرامی برای چند ثانیه تکان داده‌شده و سپس برای مدت‌زمان ۲۰ دقیقه دور از نور مستقیم در دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد) انکوبه گردید. پس از طی شدن زمان انکوبه، محلول موجود در چاهک‌ها از میکروپلیت خارج‌شده و تمام چاهک‌ها چهار مرتبه با بافر شستشو، شسته گردیدند و قطرات مانده با زدن میکروپلیت بر روی چند لایه دستمال‌کاغذی خشک و تمیز خارج شدند. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول کروموژن به درون هر چاهک اضافه شد و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵-۲۰درجه سانتی‌گراد) انکوبه شد. در این مرحله یک واکنش رنگی با رنگ آبی انجام پذیرفت که شدت رنگ ایجاد شده با میزان آفلاتوکسین موجود در نمونه رابطه معکوس داشت. در پایان میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده درون هر چاهک افزوده گردید و رنگ آبی به زرد تغییر پیدا کرد و بلافاصله مقدار جذب نوری (OD) نمونه‌ها با قرائت کننده مخصوص الایزا (Lab net, USA) در طول‌موج ۴۵۰ nm قرائت شد. جذب نوری شاهد از جذب نوری نمونه‌ها و استانداردها کسر شده، سپس با تقسیم میزان جذب نوری نمونه‌ها و استانداردها در میزان جذب نوری استاندارد صفر که

بیشترین جذب نوری را دارد، ضرب در صد، درصد جذب حاصل گردید.

$$\text{درصد جذب (OD)} - \frac{\text{درصد جذب نوری نمونه}}{\text{ماکسیمم درصد جذب نوری}} * 100$$

آنالیز آماری

داده‌های حاصل از بررسی‌های انجام‌شده با نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۳ با آزمون آماری One Way ANOVA و تست تکمیلی Tukey مورد مقایسه قرار گرفتند و موارد کمتر از $p<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته ها

نتایج بررسی میزان آفلاتوکسین در برندهای خارجی و داخلی غذای سگ در جدول ۱ آورده شده است همان‌گونه که مشاهده می گردد بالاترین میزان آفلاتوکسین مشاهده‌شده در نمونه‌های بررسی‌شده از برندهای خارجی، در میان برندهای ۱۳ و ۱۵ بوده است که به‌طور معناداری از برندهای ۳ و ۵ بیشتر بوده است ($p<۰/۰۵$). کمترین میزان آفلاتوکسین نیز در میان برندهای خارجی غذای سگ مربوط به برند شماره ۳ بوده است که به‌صورت معناداری کمتر از نمونه‌های بررسی‌شده از برندهای ۱۳، ۱۵ و ۲۰ بوده است ($p<۰/۰۵$). در میان برندهای داخلی غذای سگ، بیشترین میزان آفلاتوکسین در برند ۱۶ (۳۵/۷۵۹ ng/g) بوده است که به‌طور معناداری از برندهای ۲، ۶ و ۷ بیشتر بوده است ($p<۰/۰۵$). برند ۶ نیز کمترین میزان آفلاتوکسین (۲۶/۹۹۹ng/g) را از خود نشان داد که به‌طور معناداری از گروه‌های ۱۲، ۱۴ و ۱۶ کمتر بوده است($p<۰/۰۵$). اختلاف معناداری بین برندهای خارجی و داخلی در میزان افلاتوکسین مشاهده نگردید و تمامی برندها مقدار بالاتری از حد مجاز آفلاتوکسین (۲۰ng/g) را از خود نشان دادند (۸).

جدول (۱)- نتایج بررسی میزان آفلاتوکسین در برندهای غذای سگ

برندهای خارجی		برندهای داخلی	
نام برند	مقدار آفلاتوکسین (ng/g)	نام برند	مقدار آفلاتوکسین (ng/g)
برند ۳	^{a} ۲۲/٤٦٨	برند ۲	^{ac} ۲۷/۸٤۷
برند ۵	^{ac}۲۵/٦۳۲	برند ٦	^{a}۲٤/۹۹۹
برند ۱۰	^{ac} ۲۹/۷٤٦	برند ۷	^{ac}۲۸/۱٦٤
برند ۱۳	^{b} ۳۸/٦۰۷	برند ۱۲	^{b}۳٤/٤۹۳
برند ۱۵	^{b}۳۷/۹۷٤	برند ۱٤	^{ab}۳۱/۳۲۸
برند ۲۰	^{bc} ۳۰/٦۹۵	برند ۱٦	^{b}۳۵/۷۵۹
میانگین	۳۰/۸۵۳	میانگین	۳۰/٤۳۱

* حروف نامتشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنادار است ($p<۰/۰۵$).

نمودار رگرسیون جهت تفسیر نتایج به شرح زیر میباشد:

```
* Curve Estimation.
TSET NEWVAR=NONE.
CURVEFIT
  /VARIABLES=group WITH Result
  /CONSTANT
  /MODEL=LINEAR
  /PLOT FIT.
```

Curve Fit

Notes		
Output Created		11-MAR-2023 20:38:38
Comments		
Input	Data	C:\Users\surface\Downloads\نت ایج.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	92
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Cases with a missing value in any variable are not used in the analysis.
Syntax		CURVEFIT /VARIABLES=group WITH Result /CONSTANT /MODEL=LINEAR /PLOT FIT.
Resources	Processor Time	00:00:00,70
	Elapsed Time	00:00:00,23
Use	From	First observation
	To	Last observation
Predict	From	First Observation following the use period
	To	Last observation
Time Series Settings (TSET)	Amount of Output	PRINT = DEFAULT
	Saving New Variables	NEWVAR = NONE
	Maximum Number of Lags in Autocorrelation or Partial Autocorrelation Plots	MXAUTO = 16
	Maximum Number of Lags Per Cross-Correlation Plots	MXCROSS = 7
	Maximum Number of New Variables Generated Per Procedure	MXNEWVAR = 60
	Maximum Number of New Cases Per Procedure	MXPREDICT = 1000

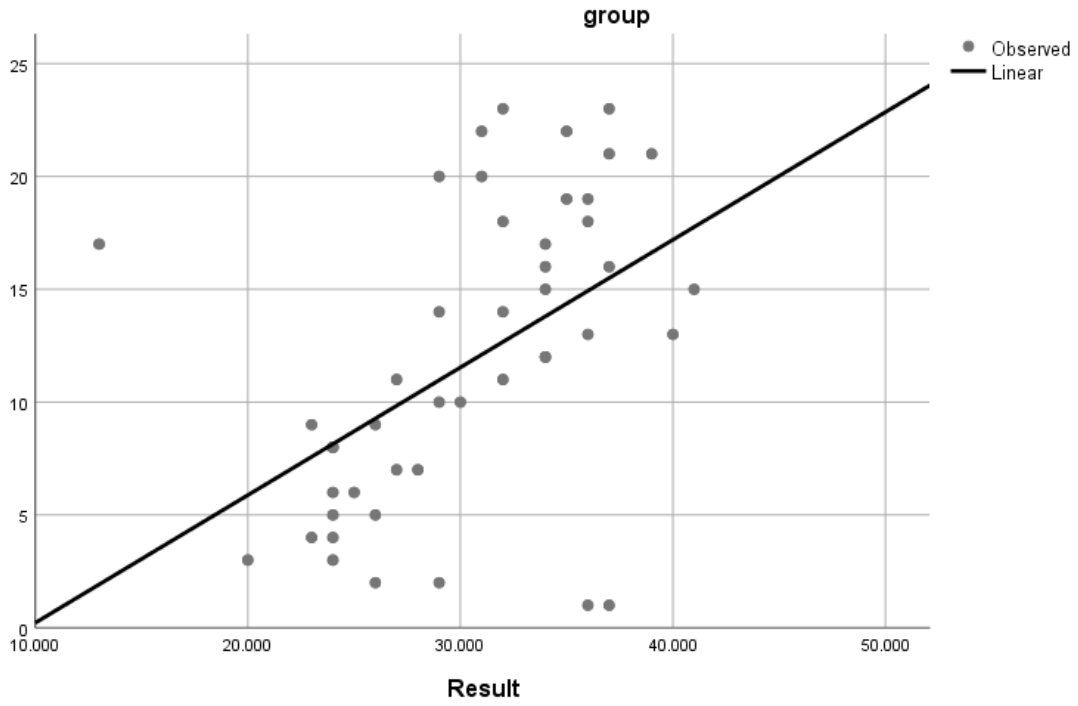
Treatment of User-Missing Values	MISSING = EXCLUDE
Confidence Interval Percentage Value	CIN = 95
Tolerance for Entering Variables in Regression Equations	TOLER = ,0001
Maximum Iterative Parameter Change	CNVERGE = ,001
Method of Calculating Std. Errors for Autocorrelations	ACFSE = IND
Length of Seasonal Period	Unspecified
Variable Whose Values Label Observations in Plots	Unspecified
Equations Include	CONSTANT

Case Processing Summary	
	N
Total Cases	92
Excluded Cases[a]	0
Forecasted Cases	0
Newly Created Cases	0
a. Cases with a missing value in any variable are excluded from the analysis.	

Model Description		
Model Name		MOD_1
Dependent Variable	1	group
Equation	1	Linear
Independent Variable		Result
Constant		Included
Variable Whose Values Label Observations in Plots		Unspecified

Variable Processing Summary			
		Variables	
		Dependent	Independent
		group	Result
Number of Positive Values		92	92
Number of Zeros		0	0
Number of Negative Values		0	0
Number of Missing Values	User-Missing	0	0
	System-Missing	0	0

Model Summary and Parameter Estimates							
Dependent Variable: group							
Equation	Model Summary					Parameter Estimates	
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1
Linear	.243	28.840	1	90	.000	-5.434	.566
The independent variable is Result.							



بحث و نتیجه گیری

میانگین آفلاتوکسین M1 در نمونه شیرهای جمع آوری شده از تانکر ذخیره شیر گاوداری‌های صنعتی ۰/۱۳۵ نانوگرم در میلی لیتر و در گاوداری‌های نیمه صنعتی ۰/۴۱۸ نانوگرم در میلی لیتر بود. از مجموع نمونه‌های اخذ شده از گاوداری‌های نیمه صنعتی تنها در ۲ مورد (۱۰درصد) مقادیر آفلاتوکسین بالاتر از حد مجاز مشاهده گردید. در حالیکه در نمونه شیرهای گاوداری‌های صنعتی در هیچ یک از نمونه‌ها، مقادیر بالاتر از حد مجاز سازمان دامپزشکی کشور (۰/۵ ppb) مشاه آلودگی غذای حیوانات به توکسین‌های قارچی و به‌خصوص آفلاتوکسین، باعث به خطر افتادن سلامت حیوان می گردد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر تمامی برندهای داخلی و خارجی بررسی‌شده آلوده به آفلاتوکسین B1 بودند که مقدار آلودگی از حد مجاز بالاتر می‌باشد. اگرچه تاکنون مطالعه‌ی در زمینه‌ی آلودگی خوراک سگ و گربه به آفلاتوکسین در ایران انجام نشده است اما برخی مطالعات صورت گرفته در کشورهای دیگر تأییدکننده نتایج پژوهش حاضر هستند. لازم به ذکر است با توجه مطالعات پیرستانی و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی مقایسه ی روش الایزا و روش آزمایشگاهی HPLC در تشخیص غلظت آفلاتوکسین شیر و علوفه ی گاو شیری نتایج نشان داده میان این دو روش اختلاف آماری معنا داری وجود ندارد (15).

Sharma و همکاران در سال ۲۰۰۱ به بررسی میزان آفلاتوکسین در ۱۲ برند از خوراک‌های سگ و گربه خانگی با استفاده از روش HPLC در کشور مکزیک پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد آفلاتوکسین B1 در تمامی نمونه‌های بررسی‌شده وجود دارد که در دو مورد

میزان آن بسیار بالا و در حد ۷۲/۴ و ۵۹/۷ نانوگرم بر گرم بوده است. آن‌ها همچنین دریافتند که میزان آلودگی خوراک گربه در مقایسه با سگ بیشتر بوده است هرچند این اختلاف ازنظر آماری معنادار نبوده است (20).

Grandi و همکاران در سال ۲۰۱۹ در پژوهش خود به بررسی میزان شیوع آلودگی به مایکوتوکسین‌ها در خوراک‌های تجاری گربه در کشور ایتالیا پرداختند. آن‌ها در مطالعه خود به بررسی ۶۴ برند خوراک گربه با استفاده از روش کروماتوگرافی پرداختند. نتایج این پژوهش نشان داد شایع‌ترین مایکوتوکسین یافت شده در خوراک‌های گربه فومونیسین می‌باشد که در ۹۶ درصد نمونه‌ها یافت گردید. درصد آلودگی به آفلاتوکسین B1 نیز در این مطالعه ۸۰ درصد بود که در سه مورد میزان آن از حد مجاز آفلاتوکسین توصیه‌شده بالاتر بود. آن‌ها بیان کردند نظارت بیشتر بر تولید خوراک گربه در این کشور ضروری می‌باشد (11).

Valladares و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه‌ی خود به بررسی میزان شیوع آفلاتوکسین در ۲۰ نمونه خوراک سگ جمع‌آوری‌شده از بازارهای شهر تولوکا در کشور مکزیک با استفاده از روش HPLC پرداختند. نتایج بررسی آن‌ها بیان‌کننده این بود که ۸۰ درصد از خوراک‌های بررسی‌شده دارای آلودگی به یکی از انواع آفلاتوکسین هستند که در ۵ مورد میزان آلودگی از حد مجاز بالاتر می‌باشد (23).

Akinrinmade و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ی خود به بررسی میزان آفلاتوکسین در ۶ برند تجاری خوراک سگ با استفاده از روش کروماتوگرافی HPLC در کشور نیجریه پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد آفلاتوکسین های B1، B2، G1 و G2 در تمامی نمونه‌های بررسی‌شده وجود داشتند که در این میان بیشترین مقدار مربوط به آفلاتوکسین B1 بود. میانگین آلودگی با آفلاتوکسین در این مطالعه ۹/۶۱ میکروگرم بر کیلوگرم به دست آمد. آن‌ها نتیجه‌گیری کردند که خوراک‌های سگ موجود در بازارهای این کشور به‌طور عمده با آفلاتوکسین آلوده هستند که ممکن است سگ‌ها را در معرض عوارض آفلاتوکسیکوزیس قرار دهد و این کشور نیازمند نظارت‌های جدی‌تری در این زمینه می‌باشد (2).

Abd-Elhakim و همکاران در سال ۲۰۱۶ به بررسی آلودگی قارچی و شیمیایی غذای سگ و گربه از ۲۰ برند غذای سگ و گربه وارداتی و داخلی در کشور مصر با استفاده از روش الیزا پرداختند. نتایج آن‌ها بیانگر این بود که در ۸۳ درصد موارد بررسی‌شده آلودگی با آفلاتوکسین وجود دارد اما تنها در یک مورد میزان آن از حد مجاز بیشتر می‌باشد (1).

Martins و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی خود میزان رخداد آفلاتوکسین B1 در ۱۰۰۱ نمونه خوراک دام در مناطق مختلف پرتغال را با روش HPLC طی مدت‌زمان ده سال بررسی کردند. آن‌ها نتیجه‌گیری کردند که آفلاتوکسین B1 در ۳۷۴ نمونه (۳۷/۴ درصد) موارد وجود دارد. در تعداد ۶۲ نمونه (۶/۲ درصد) میزان آفلاتوکسین B1 بالاتر از حد مجاز خود در کشور پرتغال یعنی ۵ میکروگرم در کیلوگرم و با دامنه‌ای از ۵/۱ تا ۷۴ میکروگرم در کیلوگرم بود (13).

هرچند برخلاف مطالعه‌ی حاضر در مطالعه‌ی که Bohm و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی ۷۶ نمونه غذای سگ از ۲۷ برند تجاری در وین اتریش به روش HPLC صورت گرفت در همه موارد بررسی‌شده فاقد مقدار قابل تشخیص آفلاتوکسین بودند اگرچه دیگر مایکوتوکسین‌ها مانند زیرالنون، اکراتوکسین و فومونیسین در مقدار اندکی تشخیص داده شدند. که

احتمالاً مربوط به کنترل و نظارت شدید بر روند تولید غذای حیوانات در این کشور اروپایی می‌باشد.(7).

همچنین Campos و همکاران در سال ۲۰۰۹ به بررسی میزان شیوع آفلاتوکسین B1 و قارچ‌های مولد آفلاتوکسین در خوراک‌های تجاری سگ در کشور برزیل پرداختند. آن‌ها در مطالعه خود تعداد ۱۸۰ نمونه غذای سگ جمع‌آوری کردند نتایج نشان داد که گونه‌های *آسپرژیلوس فلاوس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* به‌عنوان شایع‌ترین گونه‌های جداشده بودند. که به‌عنوان تولیدکننده آفلاتوکسین B1 مطرح هستند. اما در هیچ‌کدام از نمونه‌های بررسی‌شده میزان آفلاتوکسین از حد مجاز خود (۲۰ نانوگرم بر گرم خوراک) تجاوز نکرده بود (8).

Scudamore و همکاران ۱۹۹۷ به بررسی میزان مایکوتوکسین‌ها در ۳۵ نمونه خوراک سگ و گربه و ۱۵ نمونه خوراک پرنده با استفاده از روش HPLC در انگلستان پرداختند. نتایج آن‌ها نشان‌دهنده این بود که ۸۴ درصد از نمونه‌های بررسی‌شده فاقد مقدار قابل‌تشخیص آفلاتوکسین بودند. تنها در دو مورد از خوراک گربه و ۱ مورد از خوراک پرنده مقدار ۳۷۰ نانوگرم بر گرم از آفلاتوکسین B1 یافت گردید (19).

Błajet-Kosicka و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه‌ی خود به بررسی آلودگی قارچی ۲۵ برند غذای سگ و ۲۴ برند غذای گربه با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع در کشور لهستان پرداختند. آن‌ها مشاهده کردند که آلودگی با آفلاتوکسین B1 تنها در ۸ درصد موارد دیده می‌شود. که در هیچ مورد این مقدار از حد مجاز بالاتر نمی‌باشد اما برخلاف آفلاتوکسین، آلودگی با مایکوتوکسین زرالنون در ۱۰۰ درصد موارد وجود دارد (5).

در برخی مطالعات هم به این نکته اشاره شده است که خوراک‌های سگ و گربه در مقایسه با خوراک پرندگان، گاو و دیگر حیوانات از سطح آفلاتوکسین کمتری برخوردار است که مربوط به ترکیبات استفاده‌شده در خوراک و مقادیر بالاتر ذرت و سویا در آن خوراک‌ها می‌باشد (۹و19). در طول مراحل مختلف فرآوری و تولید خوراک احتمال ایجاد آلودگی قارچی وجود دارد. که نیازمند نظارت ویژه‌ای بر تولید خوراک است. علاوه بر این توجه به کیفیت مواد اولیه استفاده‌شده به‌منظور تولید خوراک سگ و گربه نیز ضروری است. کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌های استفاده‌شده در پروسه تولید خوراک باید پیش از استفاده ازنظر آلودگی به آفلاتوکسین بررسی گردند (22). همچنین امروزه در غذای خشک سگ و گربه از موادی ازجمله برنج، انواع میوه‌ها، ذرت نیز همراه با گوشت استفاده می‌شود. تحقیقات بسیاری در کشورهای مختلف انجام شده است که نشان‌دهنده احتمال آلودگی اقلام فوق به آفلاتوکسین B1 می‌باشد (18). از منظر کلینیکی اگرچه مقادیر اندک آفلاتوکسین سبب بروز علائم فوری در حیوان نمی‌گردد اما مواجه مزمن با این ماده باید جدی گرفته شود. دیده‌شده مواجه مزمن با این ماده سبب بی‌اشتهایی، بی‌حالی و لخته داخل رگی می‌گردد. همچنین ضایعات کبدی در سگ‌هایی که برای مدت ۶ تا ۸ هفته در معرض ۳/. میلی‌گرم از آفلاتوکسین بوده‌اند گزارش شده است (6).

در کشور ایران نیز در مطالعات مختلفی آلودگی خوراک دام به آفلاتوکسین‌ها گزارش گردیده است. رحیمی و همکاران در سال ۲۰۰۷ در چهارمحال بختیاری، از مجموع ۱۰۸ نمونه خوراک گاو شیری بررسی‌شده، ۷۳ نمونه (۶۷/۶ درصد) را با غلظتی در محدوده ۱۵۵/۱۸-۰/۸ میکروگرم در کیلوگرم، آلوده به

آفلاتوکسین B1 گزارش کردند که از این میان ۱۹ نمونه غلظتی بیشتر از حداکثر میزان قابل‌قبول داشتند (16).

مصری پور و همکاران در مطالعه‌ی خود در سال ۲۰۰۵ وجود آفلاتوکسن B1 را در ۹۷ نمونه خوراک گاو شامل ذرت، گندم، سبوس پنبه، جو، سبوس برنج، خوراک علوفه خشک و همچنین نان بازیافت شده در مناطق گوناگون اصفهان بررسی نمودند. آن‌ها مشاهده کردند که ۱۹ نمونه آلوده به آفلاتوکسین B1 بودند که بیشترین میزان آلودگی مربوط به نمونه‌های نان بازیافت گردیده به مقدار ۶۷ درصد و پس از آن به ترتیب آلودگی ذرت، سبوس پنبه و سبوس برنج ۳۸، ۲۵ و۱۷ درصد بود (14).

عزیزی و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه‌ی خود میزان آفلاتوکسین B1 را در ۹۶ نمونه از خوراک دام متشکل از کنسانتره، تفاله چغندر قند و کنجاله پنبه و در سه فصل بهار، تابستان و زمستان با استفاده از روش الایزا در شمال ایران بررسی نمودند. نتایج بررسی آن‌ها نشان‌دهنده این بود که ۴۴/۴ درصد از نمونه‌های اخذ گردیده از گاوداری‌های سنتی و مقدار ۴۳/۱ درصد از نمونه‌های گرفته‌شده از گاوداری‌های نیمه‌صنعتی دارای مقادیر بیش از میزان مجاز آلودگی هستند. آن‌ها همچنین میزان آفلاتوکسین B1 در فصول زمستان، بهار در کنسانتره، تفاله چغندر قند و کنجاله پنبه به ترتیب ۵۸/۸ درصد، ۴۳/۷ درصد و ۲۶/۷ درصد و در تابستان به ترتیب ۵۶/۴ درصد، ۳۸/۷ درصد و ۳۴/۴ درصد گزارش نمودند (3).

ارسالی و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی خود تعداد ۴۲۸ نمونه شامل خوراک دام و شیر را در فصول تابستان و زمستان در شیراز و حومه را با روش الایزا و کروماتوگرافی لایه‌نازک بررسی نمودند. نتایج نشان داد که در ۴۳/۳۶ درصد از نمونه‌های بررسی خوراک دام مقدار آلودگی بالاتر از حد مجاز آفلاتوکسین B1 در خوراک دام (۲۰ pbb) می‌باشد و از این نظر نیازمند توجه جدی می‌باشد. همچنین آن‌ها بیان کردند که در ۱۴/۴۲ درصد از نمونه‌های شیر بررسی‌شده میزان آلودگی به این آفلاتوکسین از حد مجاز آن (۰/۵ pbb) بالاتر بوده است (10).

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر مشخص کردند که میزان آلودگی به آفلاتوکسین B1 در تمامی نمونه‌ها از حد مجاز استاندارد بالاتر می‌باشد (4). این امر باعث بروز طیف وسیعی از اثرات زیان‌بار و مسمومیت مزمن و ضعف ایمنی در حیوانات می‌شود. بر این اساس نظارت دائمی برای آفلاتوکسین B1 توسط صنایع تولیدکننده خوراک سگ و گربه و همچنین کنترل واردات خوراک ضروری به نظر می‌رسد. همچنین توصیه می‌شود اقداماتی همچون آنالیز دوره‌ای خوراک‌های سگ و گربه، استفاده از مواد جاذب سموم در خوراک‌های آلوده، کاربرد روش‌های بیولوژیکی ازجمله اتصال مخمرها و باکتری‌ها به آفلاتوکسین و مهار عملکرد مایکوتوکسین، انجام شود. بااین‌وجود به نظر می رسد بهترین راه کنترل آلودگی به آفلاتوکسین‌ها، می‌تواند آموزش درست کشاورزان درباره مراحل داشت و برداشت محصولات جهت جلوگیری از آلودگی به قارچ‌های آسپرژیلوس جهت پیشگیری از رشد و تکثیر قارچ‌های گروه آسپرژیلوس و تولید آفلاتوکسین‌ها باشد.

منابع

1. Abd-Elhakim Y.M. (2016). An investigation of selected chemical contaminants in commercial pet foods in Egypt. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* **28:** 70-75.
2. Akinrinmade, J.F. and Akinrinde, A. S. (2012). Aflatoxin status of some commercial dry dog foods in Ibadan, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. **11:** 11463-11467.
3. Azizi, I. (2012). Determination of aflatoxin B1 levels of the feedstuffs in traditional and semi-industrial cattle farms in Amol, northern Iran. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances.* **7:** 528-534.
4. Bhat, R. V., Joint, F. and Vasanthi, S. (1999). Mycotoxin contamination of foods and feeds: *Journal of Veterinary Advances*. **9:** 28-39.
5. Błajet-Kosicka, A. (2014). Determination of moulds and mycotoxins in dry dog and cat food using liquid chromatography with mass spectrometry and fluorescence detection. *Food Additives & Contaminants: Part B*. **7:** 302-308.
6. Boermans, H.J. and Leung, M. C. (2007). Mycotoxins and the pet food industry: toxicological evidence and risk assessment. *International journal of food microbiology.* **119:** 95-102.
7. Böhm, J. (2010). Survey and risk assessment of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins, ochratoxin A, and aflatoxins in commercial dry dog food. *Mycotoxin Research*. **26:** 147-153.
8. Campos, S. (2009). Aflatoxigenic fungi and aflatoxin B1 in commercial pet food in Brazil. *World Mycotoxin Journal*. **2:** 85-90.
9. Cullen, J. M. and Hagler, W. M. 1994. *Mycotoxins, Wood Decay, Plant Stress, Biocorrosion, and General Biodeterioration.*First Edition. Springer. New York, NY. **3:** 14-19
10. Ersali, A. (2009). Transmission of aflatoxins from animal feeds to raw and pasteurized milk in shiraz city and its suburbs. *SSU_Journals*. **17**: 175-183.
11. Grandi, M. (2019). Occurrence of mycotoxins in extruded commercial cat food. *ACS omega.* **4:** 14004-14012.
12. Klich, M.A. (2007). Aspergillus flavus: the major producer of aflatoxin. *Molecular plant pathology.* **8:** 713-722.
13. Martins, H.M. (2007). Occurrence of aflatoxin B1 in dairy cow's feed over 10 years in Portugal. *Rev Iberoam Micol*. **24:** 69-71.
14. Messripour ,M. and Gheisari, M. M. (2010). Occurrence of aflatoxin B in some feedstuffs in Isfahan. *Journal of Research In Agricultural Science*. **1:** 47 - 53.
15. Pirestani, A., et al. (2012). Comparison of HPLC and Elisa for Determination of Aflatoxin Concentration in the Milk and Feeds of Dairy Cattle. *Journal of Reseach on Crop Ecophysiology.* **7:** 71
16. Rahimi, E., Kargar, A. & Zamani, F. (2008). *Assessment of aflatoxin B1 levels in animal feed of dairy farms in Chaharmahal & Bakhtiari*. First Edition. Pajouhesh_Va_Sazandegi.Tehran. **6:** 14-25
17. Razaghi, M., Soltanahmadi, Y .and Alinejad, S. (2010). *Aflatoxins and their importance in public health and agriculture*.First Edition. Agricultural Education and Promotion Institute. Tehran. **7:** 154-178. [In Persian]
18. Rushing, B.R. and Selim M.I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and chemical toxicology.* **124:** 81-100.
19. Scudamore, K., et al.1997. Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC.

Food Additives & Contaminants. **14:** 175-186.

20. Sharma, M. and Márquez, C. (2001). Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. *Animal Feed Science and Technology*. **93:** 109-114.
21. Shakeri, Z., Rahimi, E. and Shakerian, A. (2019). Evaluation of aflatoxin content in pistachio, almond, hazelnut and walnut in Isfahan. *Journal Of Food Hygiene*. **9:** 18-25. [In Persian]
22. Signos, S. Y. (2007). Aflatoxicosis: A problem to solve in veterinary medicine. *Revista electrónica de Veterinaria*. **18:** 15-36
23. Valladares-Carranza, b., Felipe-Perez, y. E., Sánchez-Torres, j. E., Caballero-Reyna, m., Zaragozabastida, a., Rivero-Perez, n.et al. (2018). Aflatoxins Determination In Commercial Dog Food .*Journal of Veterinary Medicine and Animal Sciences*. **4:** 54-98.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 18, Issue 2,
Autumn & Winter 2023

The Evaluation of Aflatoxin B1 Level in Commercially Dog and cat Foods Offered in Isfahan Province by ELISA Method

Determination Of Aflatoxin B1 By ELISA method

Parto Raeisi Dehkordi[1] ،Peyman Keihani[2*] ،Ebrahim Rahimi[3]

1. Graduated of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Shahrekord, Shahrekord, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Shahrekord, Shahrekord, Iran.

3. Professor, Departmant of Food and Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Shahrekord, Shahrekord, Iran.

Received: 28 August 2022 *Accepted: 27 April 2023*

Abstract

Aflatoxins are natural toxins that contaminate various types of food in humans and animals and pose a threat to their health. The aim of this study was to investigate the presence of aflatoxin B1 in dry cat and dog food offered in Isfahan province by ELISA method. The samples used in this study included 96 samples including 48 dog food samples from 12 commercially brands and 48 samples from 12 cat food brands that were collected by referring to pet shops in Isfahan. 200 g of sample was taken from each brand and transferred to the laboratory. It was then thoroughly ground in a mixer and tested according to the manufacturer's AFB1 Commercial Ready Kit. The results of the present study showed that the presence of aflatoxin B1 with a concentration range of 24 to 38 ng/g was detectable in the all samples. In addition, all brands showed higher levels of aflatoxin than normal level (20 ng/g). Among the studied dog food brands, no significant difference was observed between foreign and domestic brands, but in the comparison of aflatoxin levels of foreign and domestic brands of cats, the amount of this mycotoxin was higher in domestic brands. Since this mycotoxin affects the health of animals and causes serious disorders in these animals, and considering that in all brands studied in this study, aflatoxin level was higher than the allowable limit. Continuous monitoring of Aflatoxin B1 by dog and cat food industries as well as control of feed imports is essential.

Keywords: Aflatoxin B1 ، Dog and Cat food ، ELISA

**Corresponding author: Peyman Keihani*

Address: Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Shahrekord, Shahrekord, Iran.

E. mail: dr.p.keihani@gmail.com