



شماره ۶۵، زمستان ۱۳۸۳

در امور دام و آبزیان

بررسی میزان بافت‌های مخاطره‌آمیز در ارتباط با جنون گاوی در فرآورده‌های گوشتی حرارت دیده (سوسیس و کالباس معمولی) از طریق روش الیزا در تهران

- محسن مشکوه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی
- نوردهر رکنی، استاد دانشکده دامپژوهی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۸۲ | تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۸۳

چکیده

متلاعنه رخداد جنون گاوی^۱ یا آنسفالوباتی اسفنجی شکل گاوی^۲ در بریتانیا و سایر کشورهای اروپائی و به دنبال آن رخداد واریته بیماری کروتوفیلد-جاکوب^۳ در انسان و تأثیر ارتباط این دو بیماری، زنگ خطر بیماری BSE را به عنوان یک بیماری قابل انتقال بین دام و انسان به صدا در آورد. با توجه به حضور عامل بیماری در بافت‌های مخاطره آمیز مغز و نخاع شوکی^۴ امکان آلوود شدن گوشت و بالطبع فرآورده‌های گوشتی در صورت استفاده از غذر تولید آنها یا حضور بافت‌های CNS به صورت آلودگی غیرعمدی گوشت در مرحله بی‌حس کردن گاوها و یا جداسازی گوشت‌های بازیافتنی اطراف ستون مهره‌ها، دور از انتظار نمی‌باشد. این تحقیق با توجه به کار مشابهی که در دانشگاه گیسن آلمان انجام پذیرفته بود با هدف بررسی بافت‌های مخاطره آمیز از طریق تست غربالگری سریع مواد مخاطره آمیز با شناسائی پروتئین اسیدی رشتای گلیال^۵ به عنوان نشانه سلولی که به فراوانی در بافت CNS یافت می‌گردد، در فرآورده‌های گوشتی تولیدی در تهران به اجرا گذاشته شد. از تعداد ۱۹ کارخانه تولید سوسیس و کالباس تعداد ۱۸۴ نمونه برداشت شد و با دوسری کیت الیزا میزان جذب نوری استانداردها و نمونه‌ها قرائت، ثبت و مقایسه گردید. میانگین جذب نوری نمونه‌ها زیر استانداردهای شماره ۲ و نزدیک به استانداردهای شماره ۱ قرار می‌گیرند که بیانگر میزان CNS کمتر از ۰/۲ درصد و نزدیک به صفر می‌باشد. نتیجه گیری می‌شود که سوسیس و کالباس‌های تولیدی در سطح تهران از نظر احتمال خطر بیماری‌های پریونی، قادر نگرانی است.

کلمات کلیدی: آنسفالوباتی‌های اسفنجی شکل گاوی، مواد مخاطره آمیز، الیزا، سوسیس و کالباس

Pajouhesh & Sazandegi No 65 pp: 36-41

Survey on BSE risk material in heat treated meat products (sausage) with ELISA test in Tehran

By : M.Meshkat, P.H.D Student of Science and Research Campus, Islamic Azad University, Tehran and N.Rokni, Member of Scientific Board of Veterinary Faculty of Tehran University.

Following the occurrence of Mad Cow or Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in Britain and other European countries and then the appearance of new variety of Creutzfeldt-Jakob disease in man and clear demonstration of link with BSE warned the critical risk of BSE as a zoonosis. BSE agent affects brain and spinal cord , therefore meat and meat products may be contaminated in case of brain usage during processing of meat products or as an inadvertent contaminant of meat during stunning of livestock or the preparation of advanced meat recovery from vertebral column .This research has been conducted according to the same work in Gissen University-Germany for detection of risk material through Glial Fibrillary Acidic protein as cellular marker which exist in high concentration in central nervous system (CNS), in Tehran .One hundred eighty four samples were collected from 19 meat processing factories and were tested with two ELISA Kits. Light absorption rate of standards and samples were read, recorded and compared. Mean of Light absorption of samples in two stages of test were lower than the NO.2 standards and very close to standards NO.1 which indicate that the CNS content is less than 0.2% and very close to zero. In conclusion all sausages produced in Tehran with regard to prion diseases have no problem.

Key words: Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), Risk material, Elisa, Sausage.

مقدمه

آنفالوپاتی اسفنجی شکل گاوی یا جنون گاوی اولین بار در بریتانیا در سال ۱۹۸۵ در یک مزرعه به نام کنت براساس نشانه‌های بالینی مشاهده و در سال ۱۹۸۶ با آزمایشات هیستوپاتولوژیکی تایید گردید (۲، ۹). پریون^۱ عامل بیماری قدرت بقای بسیار بالائی داشته به گونه‌ای که در برایر انجماد و حرارت بسیار مقاوم بوده و در دمای پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون معمولی مقاوم می‌باشد. واژه Prion از عبارت (Proteinaceous infective particle) گرفته شده است که برای موزون به نظر رسیدن به Prion تغییر نام یافته است (۷).

پریون یک پروتئین است که خود به خود قابل تکثیر^۲ می‌باشد. تمیه خوارک دام با منشاء حیوانی (از گوسفندان مبتلا به اسکرپی) با حرارت ناکافی احتمالاً علت اصلی گسترش بیماری بوده است که منجر به مرگ بیش از ۱۸۷۰۱۸ راس گاو تا پایان سال ۲۰۰۲ در ۲۵ کشور جهان گردید (۳، ۹). با یک احتمال بالا شکل جدید بیماری کروترفیلد - جاکوب که برای اولین بار در سال ۱۹۹۵ در انسان در انگلستان گزارش گردید از طریق مصرف فرآورده‌های مخاطره آمیز گاوان مبتلا به BSE ایجاد شده است. چرا که vCJD قبل از سال ۱۹۹۵ هرگز در انسان مشاهده نشده بود، عامل آن یک پریون است که شباهت بسیار زیادی به پریون BSE دارد و مجموعه‌ای از یافته‌های آزمایشگاهی یکسان بودن عامل vCJD و BSE را نشان داده است (۱۰). میزان مرگ و میر vCJD درصد و تا سپتامبر ۲۰۰۳، ۲۰۰۴ مورد انسانی (۱۳۷) مورد در انگلستان، ۶ مورد در فرانسه، ۱ مورد در ایرلند، ۱ مورد در ایتالیا، ۱ مورد در ایالات متحده آمریکا و ۱ مورد در کانادا) رخ داده است (۱۰). هر چند در کشورهای اروپائی بافت سیستم عصبی مرکزی را از زنجیره غذائی حذف می‌نمایند اما امکان آلودگی گوشت با CNS در طی عملیات کشتن غیر ممکن نمی‌باشد (۴، ۶). بنابراین ضرورت مطالعه و بررسی حضور بافت CNS در فرآورده‌های گوشتی در هر کشوری اجتناب ناپذیر می‌باشد. امروزه تست‌های غربالگری سریع برای شناسایی بافت CNS در فرآورده‌های گوشتی به وسیله کیت‌های تشخیصی فراهم گردیده است. تست غربالگری سریع مواد مخاطره آمیز یک آزمایش ساندویچی سنجش اینمی با واسطه آنزیم برای تحلیل نیمه کمی مواد مخاطره آمیز CNS در گوشت و فرآورده‌های گوشتی است. اساس آزمایش بر واکنش پادگن - پادتن قرار دارد. شناسایی مواد مخاطره آمیز CNS از طریق تعیین حضور پروتئین اسیدی رشته‌ای گلیال به عنوان نشانه سلولی که به فراوانی در بافت سیستم عصبی مرکزی بافت می‌گردد انجام می‌شود (۵). اندازه گیری از طریق نورسنجی در ۴۵۰ نانومتر در مقایسه با استاندارد انجام پذیرفته، جذب نوری حاصله متناسب با غلظت مواد مخاطره آمیز CNS در نمونه است. نتایج مطالعات اخیر نشان می‌دهد که تست الیزای GFAP یک روش معتبر و تکرار کردنی برای شناسایی آلوگی گوشت و فرآورده‌های گوشتی با بافت CNS می‌باشد (۵، ۸).

مواد و روش‌ها

این مطالعه و تحقیق به منظور جستجو و تعیین میزان احتمالی بافت سیستم عصبی مرکزی، (مغز و طناب نخاعی) به عنوان مخاطره آمیزترین بافت بدن گاو از لحاظ انتقال بیماری های پریونی در فرآوردهای گوشتی نظیر سوسیس و کالباس حرارت دیده تولیدی در سطح استان تهران، طراحی شده است. برای این منظور تعداد نمونه و روش نمونه برداری بمنظور تعیین نتایج مطالعه به کل تولید فرآورده های مورد نظر، به روش آماری و نمونه برداری بدون اطلاع قبلی انجام گردیده و از کیت های تست غربالگری سریع مواد مخاطره آمیز شرکت بیوفارم آلمان، استفاده گردیده است. کیت آزمایش به صورت پلیت ۹۶ خانه ای یا چاهکی (۱۲×۸) بوده و کلیه معرفهای لازم برای سنجش همراه آن می باشد.

بدین منظور چاهک های پلیت با پادتن اختصاصی ضد GFAP پوشیده شده است. چنانچه نمونه مورد آزمایش حاوی بافت سیستم عصبی مرکزی باشد، محتوى GFAP آن به پادتن های اختصاصی تسخیری، متصل خواهد گردید.

GFAP متصل شده به پادتن های اختصاصی با افزودن یک پادتن کونژوگه شده با آنزیم پراکسید از ضد GFAP (کونژوگه آنزیمی)، شناسائی می گردد.

با افزودن سوبسترا، کروموزن به چاهک ها، کونژوگه آنزیمی متصل شده سبب تبدیل کروموزن قرمز رنگ به محصولی آبی رنگ می شود. افزودن معرف متوقف کننده منجر به تغییر رنگ آبی به زرد می شود. اندازه گیری از طریق نورسنجی در ۴۵۰ نانومتر صورت می گیرد. جذب نوری حاصله متناسب با غلظت مواد مخاطره آمیز در نمونه است. مقدار جذب نوری نمونه ها با مقدار جذب نوری استانداردها مقایسه می شود. بر پایه ۹۵ درصد اطمینان، ۵ درصد خطا و نتایج مطالعه به عمل آمده در کشور آلمان مبنی بر حضور بافت CNS در ۹ درصد سوسیس های حاوی جگر، تعداد نمونه مورد نیاز در این مطالعه، ۱۲۶ نمونه برآورد گردید.

از تعداد ۱۹ کارخانه تولید فرآورده های گوشتی در سطح استان تهران، تعداد ۱۸۴ نمونه سوسیس و کالباس در دو مرحله با فاصله حدود یک ماه بدون اطلاع قبلی برداشت گردید و با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه دامپزشکی پاستور در تهران منتقل و در یخچال قرار داده شد (هر چند تعداد ۱۲۶ نمونه هم از لحاظ آماری کفایت می کرد ولی به علت ظرفیت بیشتر کیت ها، تعداد ۱۸۴ نمونه گرفته شد). با توجه به تاریخ انقضایه کیتها نمونه برداری از کارخانه های سوسیس و کالباس با زمان بندی مناسبی صورت پذیرفت و بر اساس دستورالعمل همراه کیت ها، آزمایش انجام گردید.

مشاهدات و نتایج

میزان جذب نوری استانداردها و نمونه ها قرائت، ثبت و مقایسه گردیدند (جدول شماره ۱).

نتایج جذب نوری استانداردها و نمونه ها (۴ نمونه استاندارد، ۴۶ نمونه سوسیس و ۴۶ نمونه کالباس) در آزمایش شماره ۱ به شرح زیر می باشد:

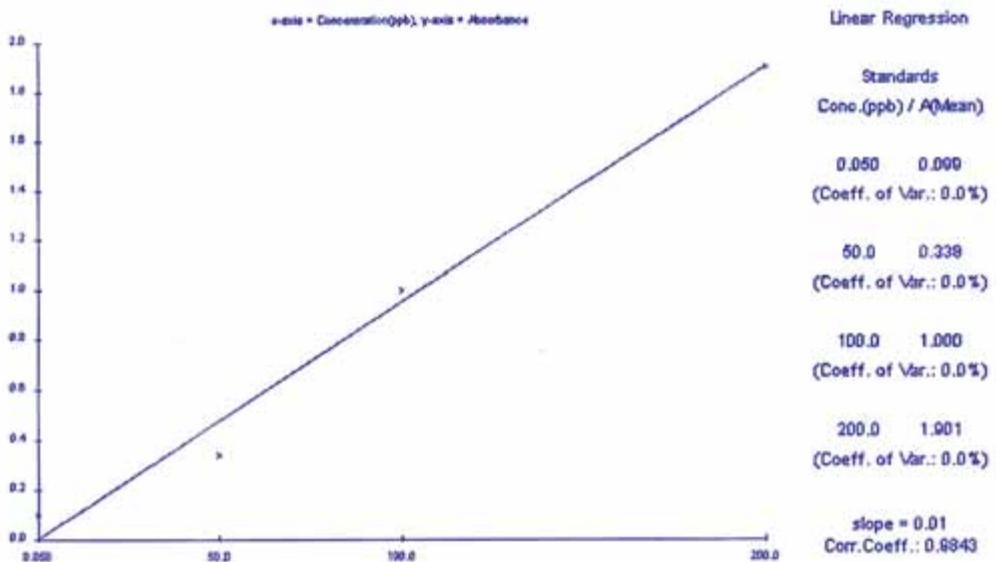
منحنی استاندارد در آزمون ارتباط خطی (منحنی شماره ۱) بین

جدول شماره ۱- نتایج میزان جذب نوری استاندارد ها و نمونه های سوسیس و کالباس در دو مرحله آزمایش الیزا

کالباس ۱	سوسیس ۱	استاندارد ۱	کالباس ۲	سوسیس ۲	استاندارد ۲
۰/۱۱۴	۰/۱۱۵	۰/۰۹۹	۰/۱۱۵	۰/۱۰۴	۰/۰۹۷
۰/۱۱۲	۰/۱۱۹	۰/۳۳۸	۰/۱۱۷	۰/۱۰۷	۰/۳۳۶
۰/۱۰۳	۰/۱۰۲	۱/۰۰۰	۰/۱۱۶	۰/۱۱۰	۰/۹۹۷
۰/۱۰۶	۰/۱۰۷	۱/۹۰۱	۰/۱۱۴	۰/۱۰۶	۱/۸۹۹
۰/۱۱۱	۰/۱۱۱		۰/۱۱۰	۰/۱۱۰	
۰/۱۱۳	۰/۱۱۳		۰/۱۱۲	۰/۱۰۸	
۰/۱۲۱	۰/۱۱۷		۰/۱۰۹	۰/۱۰۳	
۰/۱۲۳	۰/۱۱۴		۰/۱۱۱	۰/۱۰۵	
۰/۱۰۸	۰/۱۰۴		۰/۱۱۳	۰/۱۱۱	
۰/۱۰۵	۰/۱۰۶		۰/۱۱۰	۰/۱۰۹	
۰/۱۱۳	۰/۱۱۵		۰/۱۱۲	۰/۱۱۳	
۰/۱۱۰	۰/۱۱۲		۰/۱۱۵	۰/۱۰۸	
۰/۱۱۹	۰/۱۰۲		۰/۱۲۰	۰/۱۱۲	
۰/۱۲۲	۰/۱۰۵		۰/۱۱۹	۰/۱۱۰	
۰/۱۲۴	۰/۱۱۵		۰/۱۱۰	۰/۱۱۳	
۰/۱۲۰	۰/۱۱۰		۰/۱۱۰	۰/۱۱۴	
۰/۱۱۳	۰/۱۰۹		۰/۱۱۶	۰/۱۰۸	
۰/۱۱۴	۰/۱۱۱		۰/۱۲۱	۰/۱۰۳	
۰/۱۲۱	۰/۱۲۰		۰/۱۰۹	۰/۱۱۵	
۰/۱۱۶	۰/۱۱۷		۰/۱۱۲	۰/۱۱۱	
۰/۱۲۳	۰/۱۲۰		۰/۱۰۷	۰/۱۰۷	
۰/۱۲۰	۰/۱۱۷		۰/۱۱۱	۰/۱۱۱	
۰/۱۱۳	۰/۱۰۳		۰/۱۱۸	۰/۱۰۱	
۰/۱۱۰	۰/۱۰۶		۰/۱۲۰	۰/۱۰۴	
۰/۱۰۷	۰/۱۱۵		۰/۱۱۳	۰/۱۱۲	
۰/۱۱۱	۰/۱۱۳		۰/۱۱۶	۰/۱۱۰	
۰/۱۲۰	۰/۱۰۸		۰/۱۱۱	۰/۱۰۶	
۰/۱۲۳	۰/۱۱۰		۰/۱۱۴	۰/۱۱۰	
۰/۱۱۴	۰/۱۰۹		۰/۱۱۹	۰/۱۱۴	
۰/۱۱۵	۰/۱۱۱		۰/۱۱۵	۰/۱۰۹	
۰/۱۱۷	۰/۱۱۰		۰/۱۲۱	۰/۱۰۶	
۰/۱۱۲	۰/۱۱۴		۰/۱۱۸	۰/۱۱۱	
۰/۱۱۸	۰/۱۲۰		۰/۱۱۰	۰/۱۰۵	
۰/۱۲۱	۰/۱۱۸		۰/۱۱۲	۰/۱۰۹	
۰/۱۱۰	۰/۱۱۲		۰/۱۱۹	۰/۱۰۱	
۰/۱۱۵	۰/۱۰۹		۰/۱۲۰	۰/۱۰۳	
۰/۱۱۱	۰/۱۰۶		۰/۱۰۹	۰/۱۰۴	
۰/۱۱۳	۰/۱۱۰		۰/۱۱۰	۰/۱۰۶	
۰/۱۲۱	۰/۱۰۷		۰/۱۱۴	۰/۱۰۶	
۰/۱۲۲	۰/۱۰۴		۰/۱۱۲	۰/۱۰۹	
۰/۱۰۷	۰/۱۱۲		۰/۱۱۴	۰/۱۱۱	
۰/۱۱۰	۰/۱۰۹		۰/۱۱۷	۰/۱۰۷	
۰/۱۱۴	۰/۱۰۳		۰/۱۰۸	۰/۱۰۱	
۰/۱۱۹	۰/۱۱۰		۰/۱۱۲	۰/۱۰۵	
۰/۱۱۶	۰/۱۱۳		۰/۱۱۶	۰/۱۰۸	
۰/۱۱۸	۰/۱۱۱		۰/۱۲۰	۰/۱۰۴	
۵/۲۹۲	۵/۱۰۴		۵/۲۴۱	۴/۹۶	جمع
۰/۱۱۵	۰/۱۱۱		۰/۱۱۴	۰/۱۰۸	میانگین

گوشت به ویژه گوشت‌های بازیافتی سر و گردن و اطراف ستون مهره‌ها در کارخانه‌های تولید فراورده‌های گوشتی نظارت بهداشتی بر کلیه مراحل تولید گوشت اعم از گوشت‌های وارداتی و تولیدات داخلی الزام کشتارگاه‌ها و کارخانه‌های تولید فراورده‌های گوشتی در زدودن کامل نخاع شوکی از مجرای ستون مهره‌ها و امحاء آن به روش بهداشتی بازرگانی دقیق لاشه‌ها از نظر زدودن کامل نخاع شوکی استفاده از ماشین‌های اتوماتیک برای استخوانگیری به ویژه گردن و ستون مهره‌ها به جای استخوان‌گیری دستی اجرای سیستم HACCP در کشتارگاه‌ها و در کارخانه‌های فرآورده‌های

بسته بندی شده بدون استخوان شامل ران، سردست، گردن و قلوه گاه) وارداتی و گوشت بسته بندی شده منجمد بدون استخوان و یا لشه با استخوان از کشتارگاه‌های داخلی، تأمین می‌گردد. در ایران اساساً از مغز به علت قیمت بالاتر و بازار مصرف آن در طباخی‌ها و ساندویچ فروشی‌ها استفاده شده و مصرف آن در سوسیس و کالباس، رایج نمی‌باشد. نخاع شوکی نیز به لحاظ ممنوعیت‌های مذهبی در کشتارگاه‌ها و یا در سالن استخوانگیری خارج گردیده و یا همراه با مهره‌ها از گوشت‌های مورد استفاده جدا می‌گردد اما به علت جدا کردن گوشت از استخوان‌ها به خصوص گوشت‌های اطراف ستون مهره‌ها به روش دستی، امکان آسوده شدن گوشت (آلودگی جزئی)، دور از انتظار نمی‌باشد.



منحنی شماره ۱- منحنی استاندارد های شماره ۱۰۳ و ۱۰۴ کیت الیزا شماره ۱

گوشتی کنترل محصول نهایی (سوسیس و کالباس) با سرکشی‌های بدون اطلاع قبلی، برداشت نمونه و آزمایش نمونه‌ها با استفاده از کیت‌های تشخیصی معتبر، حساس، سریع و کم هزینه

پاورقی‌ها

1- Mad Cow

2- Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)

3-Variant Creutzfeldt – Jakob Disease (vCJD)

4 -Central Nervous System (CNS)

در مجموع با توجه به اینکه در کشتارگاه‌های تهران حتی در کشتارگاه‌های صنعتی، جدا کردن گوشت‌های اطراف مهره‌های گردن به روش دستی انجام می‌پذیرد، منطقی ترین کار ممنوعیت استفاده از این گوشت‌ها برای تهیه فرآورده‌های گوشتی می‌باشد و برای تضمین عدم استفاده، تجدید نظر در استاندارد ویژگی‌های سوسیس و کالباس ضروری بوده و راهکارهای نظارتی بایستی تدوین، تصویب و توسط دستگاه‌های ناظر و مسئول، به اجرا گذاشته شود.

پیشنهادات

تدوین آیین نامه‌ها و دستورالعمل‌های شفاف در خصوص استفاده از انواع

جدول شماره ۲- مقایسه نتایج غلظت CNS در استانداردها و میانگین نمونه های سوسیس و کالباس

میانگین (ppb)	نتایج آزمایش شماره ۲ (ppb)	نتایج آزمایش شماره ۱ (ppb)	نوع
۱۰/۲۹	۱۰/۳۰	۱۰/۲۸	استاندارد شماره ۱
۳۵/۴	۳۵/۴	۳۵/۴	استاندارد شماره ۲
۱۰/۴/۸۵	۱۰/۴/۸	۱۰/۴/۹	استاندارد شماره ۳
۱۹۹/۵	۱۹۹/۵	۱۹۹/۵	استاندارد شماره ۴
۱۱/۷	۱۱/۷۷	۱۱/۶۶	میانگین نمونه ها

protection,64:2047-2052.

5- Schmidt, G.R., Hossner,K.L.,and Yemm , R.S. ,1999; An enzyme – linked Immunosorbant assay for glial Fibrillary acidic protein as an indicator of the presence of brain or spinal cord in meat. Journal of food protection . Vol . 62 , No. 4,pp: 394 – 397.

6- Schmidt , Glenn and Hossner , Kim , 2001, CNS material test. American Meat Institute Foundation ,Vol .3,pp:1-2.

7- Summers ,B.,Cummings,J.,and Lahunta, A .,1995,Veterinary neuropathology,Mosby Publication, London, pp:2-10

8- Vegad,J.L.,and Katiyar,A.K.,2001; A textbook of veterinary special pathology. International Book Distributing Co.India.,pp:215-226.

9- Wilesmith , John., W. ,1998, Manual on bovine spongiform encephalopathy. Food and Agriculture Organization of the United Nations . Rome, pp: 1 – 39 .

10- World Health Organization , 2003,Variant Creutz Feldt-Jakob disease.

5- Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)

6- Prion

7 -Self - replicating

منابع مورد استفاده

۱- مرکز مدیریت بیماریها ۱۳۸۱.؛ تعاریف و نظام گزارش دهی بیماری کروتز فیلد- جاکوب و شکل جدید بیماری کروتز فیلد-جاکوب. انتشارات وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی ،صفحه ۲۵،

2- Office International des Epizooties, 2001; Disease Information,pp: 1-7

3- Office International des Epizooties ,2003; Number, of reported cases of BSE worldwide.

4-Schmidt, G.R,Childs ,K.O.,Hossner, K.L.,O., Callaghan, J.P, andYemm,R.S.,2001; The presence of central nervous system tissue on beef carcasses and in comminuted beef.Journal of Food

.....