NAISL
Volume 3, Number 4, 2020
Pages: 19-25
Print ISSN: 2588-6401
Online ISSN: 2588-641X
Website: shaajournal.msrt.ir

Overview of the important of ELISA technique and application in food industry

Maryam Ghayoor Kazemi[1], Javad Feizy[2*]

Abstract

It is essential to maintain the safety and health of consumers by controlling toxic pollutants and detecting fraud in the food industry. Using conventional techniques for detecting and screening for toxins and contaminants in food, antibiotics and pathogens in the food processing industry will be highly costly and time-consuming. Therefore, the application of immunological methods such as ELISA with low time, no need for advanced equipment, low cost and high accuracy to introduce food quality and safety was introduced. This in vitro technique to confirm food in the form of indirect ELISA and sandwich ELISA possible to analyze many samples simultaneously provides. This method in immunology to detect the presence of an antibody or antigen in food samples, pesticide residues, pathogenic microorganisms, and ultimately natural will be plan extracted that generally as a diagnostic tool in medicine and pathology, as well as quality control testing used in many industries, especially the food industry. Over the past years the development of technology for screening and detection has been improved in the production of commercial ELISA kits, that the use of kits for the identification of food ingredients and their changes during the function and processing for safety evaluation has been discussed. This review paper the importance of the ELISA technique and its application in the detection of genetically modified foods, allergens, and ultimately food fraud.

Key Words:

ELISA technique,
Food fraud,
Immunological reaction,
Diagnosis of allergens,
Safety and quality.

(*) Corrosponding author
1. Master of science of Biochemistry, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad. Iran.
E-mail: m.ghayoor@rifst.ac.ir
Tel: 05135425372
2.Assistant Professor of Analytical Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran.
E-mail:j.feizy@rifst.ac.ir
Tel: 05135425371

مروری بر اهمیت تکنیک الایزا و کاربرد آن در صنایع غذایی

مریم غیور کاظمی[1*]، جواد فیضی[2*]

نشریه رویکردهای نوین در آزمایشگاه‌های علمی ایران
سال سوم، شماره ۴، ۱۳۹۸
صفحات: ۲۵-۱۸
شاپای چاپی: ۶۴۰۱-۲۵۸۸
شاپای الکترونیکی: ۶۴۱X-۲۵۸۸
وب‌سایت: shaajournal.msrt.ir

چکیده

حفظ ایمنی و سلامت مصرف‌کنندگان با کنترل آلاینده‌های سمی و تشخیص تقلبات در صنعت غذا امری ضروری بنظر می‌رسد. بکارگیری تکنیک‌های مرسوم جهت شناسایی و غربال‌گری سموم و آلاینده‌های غذایی، آنتی‌بیوتیک‌ها و پاتوژن‌ها در صنعت فرآوری مواد غذایی امری پرهزینه و بسیار وقت‌گیر خواهد بود، از این رو بکارگیری روش‌های ایمونولوژیکی نظیر الایزا با کم‌ترین زمان، عدم نیاز به تجهیزات پیشرفته، کاهش هزینه و دقت بالا جهت ارزیابی کیفیت و ایمنی مواد غذایی معرفی گردید. این تکنیک آزمایشگاهي جهت تایید مواد غذایی به دو فرم الایزا غیر مستقیم و الایزا مستقیم تقسیم می‌گردد که امکان آنالیز تعداد زیادي نمونه را به صورت همزمان فراهم می‌سازد. این روش در ایمني‌شناسي براي تشخیص وجود يك آنتي‌بادي یا آنتي‌ژن در نمونه‌های غذایی، باقی‌مانده آفت‌کش‌ها، میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و در نهایت عصاره‌های طبیعی گیاهی استخراج شده استفاده خواهد شد. عموماً به عنوان ابزاري تشخیصي در پزشكي و پاتولوژي و همچنین تست کنترل کیفیت در بسیاري از صنایع بالاخص صنایع غذایی کاربرد دارد. در طی سالیان گذشته توسعه فناوری الایزا جهت غربال‌گری و تشخیص، موجب پیشرفت در تولید انواع کیت‌های تجاری شده است، که در این میان استفاده از کیت‌ها برای شناسایی ترکیبات مواد غذایی و تغییرات آن‌ها در طول فرایند و فرآوری به منظور ارزیابی ایمنی روز به روز اهمیت ویژه پیدا کرده است. این مقاله مروری بر اهمیت تکنیک الایزا و کاربرد آن در تشخیص غذاهای اصلاح شده ژنتیکی، ترکیبات آلرژن و در نهایت تقلبات در مواد غذایی پرداخته شد.

مریم غیور کاظمی — جواد فیضی

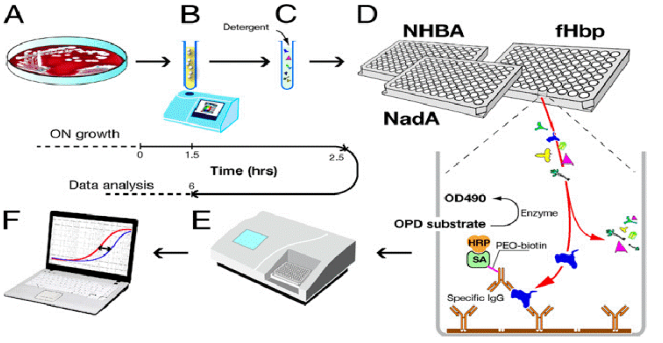
واژگان کلیدی:

تکنیک الایزا،
تقلبات مواد غذایی،
واکنش ایمونولوژیکی،
تشخیص آلرژن،
ایمنی و کیفیت

(*) مسئول مکاتبات.
۱. کارشناس ارشد بیوشیمی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.
ایمیل: m.ghayoor@rifst.ac.ir
تلفن: ۰۵۱۳۵۴۲۵۳۷۲
۲. رئیس آزمایشگاه مرکزی و استادیار گروه ایمنی و کنترل کیفیت مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.
ایمیل: j.feizy@rifst.ac.ir
تلفن: ۰۵۱۳۵۴۲۵۳۷۱

۱ مقدمه

الایزا[1] یك روش آزمایشگاهي بیوشیمیایي ساده با حساسیت بسیار بالا است که امکان آنالیز تعداد زیادي نمونه را به صورت همزمان فراهم می‌کند. تکنیک الایزا نتیجه اتصال آنتی‌ژن به آنتی‌بادی خاص است که اجازه می‌دهد تا مقدار کمی از آنتی‌ژن‌ها نظیر پروتئین، پپتید، هورمون‌ها در یک نمونه مایع تشخیص داده شوند. همچنین برخی از ترکیبات نشاندار شده با آنزیم و آنتی‌بادی، مولکول‌های بیولوژیکی را شناسایی می‌کند، که در این میان آنزیم‌های استفاده شده بیش‌تر فسفاتاز قلیایی و گلوکز اکسیداز هستند(۱). عملکرد تکنیک الایزا بر پایه اندازه‌گیری کمپلکس رنگی آنتي‌ژن و آنتي‌بادی استوار است. به این ترتیب که نمونه مورد آزمایش با مقدار نامشخصی آنتي‌ژن روی فاز جامد (معمولا پلیت پلي استیرن) ریخته می‌شود، سپس آنتي‌بادی بازیابی اضافه می‌گردد تا با آنتی‌ژن واکنش داده و کمپلکسی ایجاد کند. آنتي‌بادی بازیابی با آنزیم پیوندی کووالانسي برقرار می‌کند. بین هر مرحله پلیت با محلول پاك کننده ملایمی شسته شده تا هر پروتئین یا آنتي‌بادی باقیمانده حذف گردد. پیش از آخرین مرحله شستشو، پلیت با اضافه کردن زیر لایه آنزیمی کشت داده می‌شود و ماده رنگی تولید می‌شود. طول موج رنگ به دست آمده توسط یك دستگاه طیف‌سنج نوری قرائت شده و ثبت مي‌شود که این جذب اندازه‌گیری شده معرف حضور یك آنتي‌بادي یا آنتي‌ژن و نیز غلظت آن است. در الایزاهاي قدیمي‌تر زیرلایه رنگ‌زا به کار گرفته مي‌شد در حالي‌که در تست‌هاي جدیدتر زیرلایه‌هاي اختصاصی با حساسیت بسیار بالاتر مورد استفاده قرار مي‌گیرد(۲). آنزیم‌های مورد استفاده در تکنیک الایزا باید وزن مولکولی نسبی کم، ثبات بالا و ارزان در دسترس باشد که بتواند با برقراری پیوند کوالانسی با آنتی‌بادی و گروه‌های مختلف آنتی‌ژنی متصل شوند تا سبب ایجاد رنگ گردد. از جمله آنزیم‌های که این شرایط را دارد هورس رادیش پراکسیداز[2] است. آنتی‌ژن معمولا در صفحات ۹۶ خانه‌ای میکروتیتر پلیت[3] تثبیت شده و به آن اجاره داده شده به یک آنتی‌بادی خاص متصل شود، که به خودی خود توسط آنتی‌بادی ثانویه جفت شده با آنزیم، شناسایی می‌شود. بستر کروموژنیک برای آنزیم یک تغییر رنگ قابل مشاهده یا فلورسانس را نشان می‌دهد که نشانگر حضور آنتی‌ژن است(۳). اندازه‌گیری کمی یا کیفی می‌تواند براساس خوانش کالریمتری انجام گردد(شکل ۱).



شکل ۱- شماتیکی از تکنیک الایزا در یک نمونه (٤)

الایزا روش بسیار حساس و دقیقی برای برآورد پارامترهای بیولوژیک است، با این مزیت که می‌تواند تعداد زیادی نمونه را با سرعت مورد تجزیه و تحلیل قرار دهد. این آزمون چند منظوره بوده و به طیف گسترده‌ای از زمینه‌های بیولوژیکی مانند، ویروس‌های، باکتری‌ها، قارچ‌ها و پروتئوزا اعمال شده است(۱).

۲- مراحل انجام آزمون الایزا:

تست الایزا با روش‌های گوناگوني انجام می‌شود که به صورت کلی به دو دسته الایزا مستقیم و غیر مستقیم تقسیم‌بندی می‌گردد. در روش مستقیم آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی مورد نظر به طور مستقیم بر سطح فاز جامد پوشش داده می‌شود و سپس آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن مکمل نشان‌دار شده آن به سیستم اضافه می‌شود. با آنالیز سیگنال تولید شده می‌توان پی به وجود آنتي‌ژن یا آنتي‌بادی مورد نظر در نمونه برد. این روش ارزش تشخیصی چندانی نداشته و بیش‌تر کاربرد تحقیقاتی دارد. در روش غیر مستقیم سرم رقیق شده به آنتي‌ژن‌های پوشش داده شده در فاز جامد اضافه می‌شود، سپس نمونه را به آن اضافه کرده و پس از گذشت زمان گرمخانه‌گذاری و یك مرحله شستشو، آنتی هیومن گلوبولین نشاندار شده با آنزیم به چاهك اضافه مي¬شود. این روش براي تعیین آنتي بادي اختصاصي یا تیتراسیون آنتي بادي در سرم استفاده می‌شود (۳).

بر این اساس مراحل انجام آزمون الایزا عبارت است از: ۱) پوشش‌دهي، که به معني جذب یك آنتي‌ژن یا آنتي‌بادي با سطوح جامد است. ۲) اضافه کردن نمونه‌هاي مورد آزمایش. ۳) گذشت مدت زمان کافی برای انجام واکنش که به اصطلاح گرمخانه‌گذاری واکنش‌گرها نامیده می‌شود. ٤) انجام عمل شستشو توسط محلول شوینده الایزا، به منظور جدا کردن واکنش‌گرهای متصل شده و واکنش داده از واکنش‌گرهای آزاد و متصل نشده. ٥) افزودن ترکیبات انصال دهنده با آنزیم. ٦) مجددا طی مدت زمان انکوباسیون براي واکنش‌گرها. ۷) استفاده مجدد از واشر الایزا جهت انجام عمل شستشو. ۸) افزودن زیر لایه آنزیم جهت تشخیص واکنش‌دهنده‌ها. ۹) برنامه زمانی گرمخانه‌گذاری. ۱۰) اتمام واکنش آنزیمی توسط خاموش کننده‌ها و خوانش دانسیته نوری به دست آمده توسط الایزا ریدر صورت می‌گیرد (۲).

[1] Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)
[2] Horsradish peroxidase
[3] Microtiter Plates

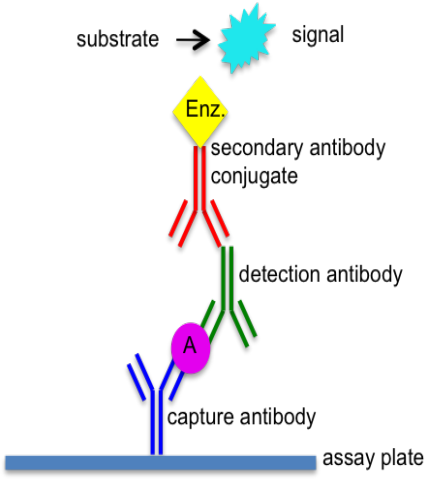
۳-انواع روش الایزا

۳-۱- الایزای رقابتی

الایزای رقابتی [۴] یا مهاری از دیگر انواع متداول این تکنیك هستند. که در روش رقابتی بر پایه رقابت دو آنتی‌ژن یا دو آنتی‌بادی برای اتصال لیگاند با مقدار محدود استوار است. در طی گرمخانه‌گذاری، آنتی‌ژن نشان‌دار با آنتی‌ژن استاندارد یا مورد آزمون غیر نشان‌دار رقابت می‌کند، پس از گرمخانه‌گذاری، چاهک‌های واکنش با یک بافر مناسب برای حذف واکنش دهنده‌های آزاد شسته می‌شود. سپس یک محلول سوبسترا اضافه شده که پس از تجزیه توسط آنزیم موجود در ترکیب، یک محصول رنگی تولید می‌کند. مزیت اصلی الایزای رقابتی حساسیت بالا نسبت به تفاوت ترکیبات در مخلوط‌های پیچیده آنتی‌ژن است، حتی زمانی که آنتی‌بادی تشخیص خاصی در مقدار نسبتاً کم باشد. بر این اساس اگر اضافه کردن هر دو آنالیت به سیستم همزمان انجام شود، روش را رقابتی می‌نامند ولی چنانچه ابتدا آنالیت اضافه شده و پس از یك دوره زمانی گرمخانه‌گذاری آنالیت نشان‌دار اضافه گردد روش را مهاری می‌نامند(۵).

۳-۲- الایزای ساندویچی

در روش ساندویچ که متداول‌ترین روش الایزا است، یك آنتی‌ژن در بین دو آنتی‌بادی اختصاصی قرار می‌گیرد. در واقع در این تکنیک ابتدا آنتی‌بادی با یک فاز جامد اتصال برقرار می‌کند(شکل ۲). مقدار معینی از نمونه که آنتی‌ژن به آن متصل شده، پس از شست و شو آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار با آنزیم اضافه می‌شود که با آنتی‌ژن‌های باقی مانده واکنش داده و سپس به آنتی‌بادی تثبیت شده متصل می‌گردد. این تکنیک بسیار ساده و با افزایش اختصاصیت و حساسیت همراه است (۱).



شکل۱: ست آپ آزمایشگاهی برای کالیبراسیون یک سنسور رطوبت

- عملکرد الایزا در صنعت مواد غذایی

در جهان امروز امنیت و سلامت غذایی در کنار ارزش-گذاری به محصولات غذایی به دور از تقلبات از مهم‌ترین اولویت‌های انسان شناخته می‌شود. به همین دلیل روش‌های نوین پایش و ارزیابی کیفی ضمن تقویت کنترل چرخه غذا از مزرعه تا مصرف و با داشتن نظارت علمی برای تضمین سلامت انسان و اطمینان خاطر برای مصرف کننده فراهم می‌سازد. صنعتی شدن محصولات غذایی و کشاورزی استراتژی است که ضمانت دسترسی مداوم به مواد غذایی را امکانپذیر می‌سازد. با این حال خطرهای شیمیایی، فیزیکی و زیستی از برداشت تا انبارداری و بازاریابی محصولات می‌تواند بر کیفیت، سلامت و ایمنی مواد غذایی اثرگذار باشد. آلاینده‌های تهدیدکننده امنیت و سلامت غذایی ممکن است از نوع میکروبی، مواد خارجی (اعم از زیستی، شیمیایی یا فیزیکی)، سموم طبیعی، سایر ترکیبات شیمیایی و مواد بسته‌بندی باشند (۷). اگرچه آلاینده‌های زنجیره غذا را می‌توان به روش‌های شیمیایی و کشت‌های آزمایشگاهی شناسایی کرد، اما با بکارگیری از فناوری‌های نوین نظیر الایزا به حفظ زنجیره غذا در اکوسیستم غذایی کمک می‌گردد. در واقع روش‌های ایمونولوژیکی می‌تواند برای تعیین حضور ترکیبات شیمیایی و میکروارگانیسم‌ها در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرد. با توسعه در روش‌های ایمونولوژیکی می‌توان آنتی‌ژن برخی از مواد شیمیایی، سموم میکروبی یا ساختار سلولی تخمین زده می‌شود، همچنین در فرم‌های خالص با اتصال به یک پروتئین مانند آلبومین سرم گاوی، به حیوانات آزمایشگاهی مانند موش و یا خرگوش برای تولید آنتی‌بادی اختصاصی تزریق می‌شوند (۸). آنتی‌بادی‌های تولیدی شامل پلی‌کلونال و مونوکلونال بوده که بترتیب در حالت اول در سرم حیوان واکسینه شده تولید می‌گردد که با چندین محل آنتی‌ژن واکنش می‌دهد. در نوع دوم پس از تزریق لنفوسیت B التهابی حاصل از موش‌های واکسینه شده با سلول‌های میلوما[۵] تهیه شده و با غربالگری کلنی‌های که آنتی‌بادی مونوکلونال را ترشح کرده، همراه است (۹).

در سال‌های اخیر شناسایی ترکیبات مختلف فرآورده‌های غذایی بر پایه ترکیبات پروتئینی نظیر گوشت، ماهی و غذاهای دریایی، شیر و فراورده‌های لبنی براساس تکنیک‌های ژنتیکی و ایمونولوژیکی نظیر الایزا به علت سادگی، اختصاصیت و حساسیت به طور گسترده در تعیین تقلبات آن‌ها استفاده گردید (۱۰). بعنوان مثال در فراورده‌های پروتئینی نظیر گوشت، نوع گوشت بخصوص تقلب در نوع گوشت چرخ شده در فراورده‌های خمیری بسیار شایع است، از این رو تعیین

[۴] Competitive ELISA

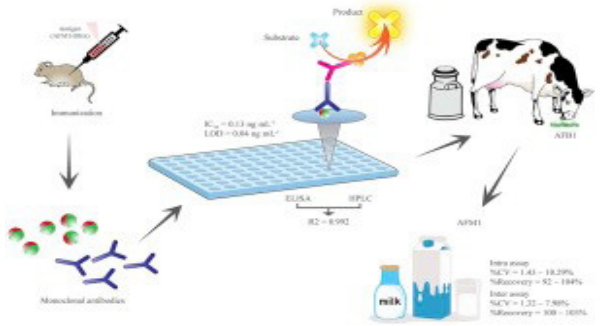
[۵] Myeloma

منشا گوشت و عدم تقلب در ساختار آن براساس حساسیت برخی افراد به ترکیبات آلرژن، دلایل اعتقادی-مذهبی امری بسیار ضروری بنظر می‌رسد. بنابراین برای تعیین و شناسایی ترکیبات غذایی حیوانی به ابزارهای تشخیصی حساس و مطمئن احتیاج است تا برای آزمایشات روزمره و حجم زیادی از نمونه‌ها تکنیک الایزا دارای اختصاصیت بیش‌تری نسبت به روش‌های ژنتیکی می‌باشد. در نتیجه در طی سال‌های اخیر برای شناسایی منشا ترکیبات گوشت حیوانی از تکنیک الایزا با استفاده از آنتی‌بادی‌هایی علیه پروتئین‌های سرم یا ماهیچه‌ای حیوانی پایدار به حرارت استفاده می‌گردد (۱۱).

در فراورده‌های بر پایه ماهی یا گوشت ماهی، تمیز کردن در طی فراوری خصوصیات ساختاری ماهی را بین برده و تشخیص گونه‌های ماهی را بسیار مشکل می‌سازد و زمینه برای وارد کردن تقلبات مختلف و استفاده از ماهی‌های قیمت پایین به جای ماهی‌های با قیمت بالا را فراهم می‌نماید. برای جلوگیری از چنین تقلباتی آزمایشگاه‌های مواد غذایی برای شناسایی گونه‌های ماهی استفاده شده در تولید ماهی به تکنیک‌های سریع و کم هزینه‌ای مانند الایزا نیاز دارند. شناسایی گونه‌های ماهی اغلب توسط روش‌های مستقل از کشت نظیر PCR[۶] و الایزا صورت می‌گیرد. اما روش الایزا کم هزینه‌تر و ساده‌تر از روش‌های مولکولی است و می‌تواند به صورت روزمره برای تعداد زیادی از نمونه‌ها استفاده شود. در پژوهشی، پلی‌کلونال آنتی‌بادی‌هایی علیه پروتئین‌های ماهیچه‌ای ماهی‌های گیدر و ساردین تولید شده‌اند. علاوه بر این منوکلونال آنتی‌بادی‌هایی علیه پروتئین‌های ماهیچه‌ای ماهی‌ها تولید شده‌اند که قادر به شناسایی برخی از گونه‌های کم مرغوب نسبت به گونه‌های مرغوب هستند، به علت تنوع زیاد گونه‌های ماهی که به طور تجاری در دسترس می‌باشند برای شناسایی گونه‌های ماهی کیت الایزای تجاری زیادی موجود نیست بنابراین توسعه آینده کیت‌های تشخیصی سریع در این زمینه می‌تواند مفید باشد (۱۲).

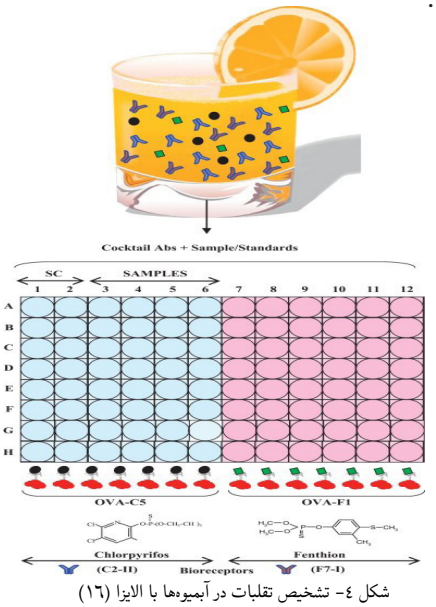
در فراورده‌های لبنی تولید محصولات مختلف بر پایه شیر امکان تقلب در آن‌ها وجود دارد (شکل ۳). به عنوان مثال در تولید پنیر از شیر گوسفند به علت قیمت بیش‌تر شیر گوسفند نسبت به شیر گاو و برای کاهش هزینه‌های تولید، استفاده از ترکیبات شیر گاوی دچار بیماری التهاب پستان که سرشار آنتی‌بیوتیک بوده و ارزان قیمت‌تر است بسیار شایع بوده که به علت حساسیت‌زا بودن برخی از افراد به شیر گاو و قوانین قانونی و مذهبی تشخیص این ترکیبات از اهمیت بالایی برخوردار است. بنابراین برای ارزیابی پنیرهای حاصل از شیر گوسفند یا بز به ارزیابی صحیحی از گونه‌های شیر استفاده شده در فراورده‌های لبنی نیاز است. لذا به دلایل قانونی و برای محافظت مصرف‌کننده باید نوع شیر استفاده شده در فراورده‌های لبنی به طور صحیحی با استفاده از روش‌های حساس و مطمئن مانند الایزا مشخص شود. تکنیک الایزا به علت سریع بودن و و اختصاصیت و حساسیت بالا به طور گسترده برای شناسایی گونه‌های شیر استفاده می‌شود.

در روش الایزا آنتی‌بادی‌هایی علیه پروتئین‌های غالب شیر مانند کازئین با لاکتالبومین تولید می‌شوند که با استفاده از تکنیک‌های مختلف الایزا نوع رقابتی و یا ساندویچ می‌توان تقلبات شیرهای گوسفند یا بوفالو را با شیر گاو تعیین و شناسایی کرد (۱۳ و ۱٤).



شکل ۳- تعیین منشا شیر و لبنیات با الایزا (۱۵)

در بحث نوشیدنی‌های مرکبات امنیت و کنترل کیفیت از اهمیت حیاتی برخوردار است زیرا امکان تقلب در این محصولات بسیار بالا است. تقلب می‌تواند بر اساس یک رقیق‌سازی ساده با آب یا جایگزینی مواد ارزان‌تر مصنوعی (قندها، اسیدها و رنگ‌ها) و یا مکمل‌های آب مرکبات با پالپ با عصاره‌های پوست باشد (شکل ٤). برای اطمینان از حفاظت از مصرف‌کنندگان، ابزارهای تحلیلی قابل اعتماد و حساس برای تشخیص تقلبات در آبمیوه‌ها لازم است. بر این اساس آنتی بادی‌های پلی‌کلونال علیه پپتیدهای پوست با آبمیوه گریپ فروت و پرتقال تولید کردند که این آنتی‌بادی‌ها در روش الایزا برای شناسایی تقلبات در آبمیوه جات استفاده می‌گردد (۱۵).



شکل ٤- تشخیص تقلبات در آبمیوه‌ها با الایزا (۱٦)

[۶] Polymerase chain reaction

۵- روش ایمونولوژیکی جهت تخمین و پایش میکروارگانیسم‌های زنده

فساد میکروبی (باکتریایی و قارچی) غذاها از نگرانی‌های عمده تولید و فرآوری مواد غذایی هستند. پیشگیری از وقوع این فرایندهای آسیب‌پذیر باعث بهبود دسترسی به مواد غذایی و کاهش قیمت تمام شده می‌گردد. روش‌های ایمونولوژیکی برای شناسایی و تخمین جمعیت میکروارگانیسم‌های عامل فساد و مواد تشکیل دهنده که منجر به مشکلات مهم در کیفیت برای تولید و فرآوری مواد غذایی شده، مورد استفاده قرار می‌گیرد. فساد مواد غذایی به علت فعالیت‌های میکروبی و ارگانیسم‌ها در طی مراحل قبل از برداشت، برداشت و پس از برداشت گاهی می‌تواند ۲۰ درصد از تلفات مواد غذایی را شامل شود. فساد مواد غذایی توسط انواع کپک‌ها و گونه های باکتریایی ایجاد می‌شود، روش‌های ایمونولوژیکی نظیر الایزا قابلیت کنترل و جلوگیری از فساد موادغذایی با استفاده از تشخیص زود هنگام ارگانیسم‌های زنده و تخمین جمعیت و پایش جمعیت میکروبی آن‌ها، استفاده شد. بعنوان مثال در کپک و مخمرها ترکیبات آنتی‌ژنیک موجود در عصاره‌های کپک می‌تواند برای آزمایش ایمونوفلورسنت یا الایزا به منظور تعیین تعداد کپک استفاده شود. شمارش کپک در پوره گوجه فرنگی توسط الایزا صد برابر حساس‌تر از روش کروماتوگرافی است، بر خلاف روش‌های کشت متداول که به چند روز زمان نیاز داشته آزمایش الایزا تنها ۵ تا ۱۰ ساعت زمان می برد. همچنین زمان آزمایش را می‌توان با استفاده از روش آگلوتیناسین لاتکس به ۱۰ تا ۲۰ دقیقه کاهش داد. با این حال، حساسیت این روش پنج تا ده برابر کم‌تر از تکنیک الایزا خواهد بود. روش‌های مرسوم همچنان مزایای خاصی را نسبت به آزمایشات ایمنی ارائه می‌دهند. بسیاری از قارچ‌های خوراکی را با استفاده از میکروسکوپ نوری با بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی اسپور و میسیلیوم شناسایی می‌شوند. از آنجایی که آنتی‌بادی‌هایی که در مقابل هیف قارچی با سوپرناتانت‌های کشت ایجاد شده‌اند، ویژگی خاصی برای شناسایی میکروارگانیسم ندارند. بر این اساس آنتی‌ژن‌های مخصوص نظیر آنزیم‌ها، سموم و اگزوپلی‌ساکاریدهای میکروبی بعنوان متابولیت ثانویه میکروبی برای تولید آنتی‌بادی استفاده می‌شود (۹ و ۱۷).

۶- روش ایمونولوژیکی جهت تخمین مایکوتوکسین

آنتی‌بادی با اتصال به ترکیبات پروتئینی کوچک نظیر مایکوتوکسین بعنوان پارازیت عمل می‌کند. مطالعات گسترده به توسعه روش‌های ایمونولوژیکی و کاربرد آن در تشخیص مایکوتوکسین در غذا مشخص شد، که در این میان دو روش RIA[۷] و الایزا قادر به تشخیص مایکوتوکسین‌ها بوده اما تکنیک الایزا حساسیت بیش‌تری نسبت RIA در برآورد سطوح مختلف مایکوتوکسین‌های غذایی نشان داده است و نتایج دقیق‌تر و بهتری در تخمین آفلاتوکسین را در ذرت، گندم و کره بادام زمینی ارایه داده است. توسعه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال برای آفلاتوکسین‌ها حساسیت آزمایش الایزا را افزایش داده است. آنتی‌بادی مونوکلونال مطرح شده در برابر آفلاتوکسین، در ستون‌های جذبی برای پاکسازی عصاره استفاده شده که مایکوتوکسین خالص با غلظت ۰/۵ نانوگرم توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا قابل تشخیص بود. این روش غربالگری تنها ۱۰ دقیقه زمان می‌برد. آنتی‌بادی‌هایی که علیه آفلاتوکسین دی هیدرودیول مطرح شده در الایزا برای ارزیابی و ردیابی آفلاتوکسین B_1 در غذاهای فرآوری شده و یا در سیستم‌های بیولوژیک استفاده شود (۹ و ۸۱).

۷- نتیجه‌گیری

امروزه شناسایی ترکیبات آلرژن در مواد غذایی به عنوان یکی از مشکلات سلامت عمومی از اهمیت زیادی برخوردار است. حتی جذب کمی از ترکیبات آلرژن می‌تواند باعث واکنش‌های آلرژیک در مصرف کننده شود. بنابراین تنها راه جلوگیری موثر، دوری از مواد غذایی محتوی این ترکیبات آلرژن می‌باشد لذا طبق قوانین وضع شده باید ترکیبات غذایی آلرژن روی بر چسب مواد غذایی ذکر شوند. بنابراین، توسعه سیستم‌های سریع، حساس، دقیق و ارزان برای تشخیص و کنترل تقلبات غذایی از مواردی است که اخیرا بسیار مورد توجه قرار گرفته است، از طیف گسترده‌ای از روش‌های تحلیلی موجود، الایزا برای تعیین کیفیت مواد غذایی مناسب است، به دلیل حساسیت و اختصاصی بودن و همچنین عملکرد سریع آن در تشخیص و شناسایی ترکیبات غذایی و از سلامت محافظت مصرف‌کنندگان در برابر اقدامات جعلی در صنایع غذایی محافظت می‌نماید.

مراجع

[1]. Gan, S.D. and Patel, K.R., 2013. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. J Invest Dermatol, 133(9), p.e12.

[2]. Tran, D., 2013. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Detection of Pecan Residues in Processed Foods. M.Sc.thesis the Faculty of The Graduate College of the University of Nebraska, Lincoln.

[۷] radioimmunoassay (RIA)

[3]. Donnelly, J., Medini, D., Boccadifuoco, G., Biolchi, A., Ward, J., Frasch, C., Moxon, E.R., Stella, M., Comanducci, M., Bambini, S. and Muzzi, A., 2010. Qualitative and quantitative assessment of meningococcal antigens to evaluate the potential strain coverage of protein-based vaccines. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(45), pp.19490-19495.

[4] . Waritani, T., Chang, J., McKinney, B., & Terato, K. 2017. An ELISA protocol to improve the accuracy and reliability of serological antibody assays. Methods, 4, 153-165.

[5]. Dobrovolskaia, E., Gam, A. and Slater, J.E., 2006. Competition enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) can be a sensitive method for the specific detection of small quantities of allergen in a complex mixture. Clinical & Experimental Allergy, 36(4), pp.525-530.

[6]. Sakamoto,S.,Putalun,W.,Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H., & Morimoto, S. 2018. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. Journal of natural medicines, 72(1), 32-42.

[7]. Sattari, M., Mohammad Hassan, Z., Azizi, T., Mahdavi, M., Khoramabadi, N., Sadrai, S.H. and Hosainydoust, S.R., 2007. Mitogenic Stimulation of Murine Lymphocyte Cells by Exposure to Staphylococcal Aureus Enterotoxin B. Journal Mil Med, 9(1), pp.23-29.

[8]. Felin, E., Näreaho, A., & Fredriksson-Ahomaa, M. 2017. Comparison of commercial ELISA tests for the detection of Toxoplasma antibodies in the meat juice of naturally infected pigs. Veterinary parasitology, 238, 30-34.

[9]. Samarajeewa, U., Wei, C.I., Huang, T.S. and Marshall, M.R., 1991. Application of immunoassay in the food industry. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 29(6), pp.403-434.

[10]. Reid, L.M., O'donnell, C.P. and Downey, G., 2006. Recent technological advances for the determination of food authenticity. Trends in Food Science & Technology, 17(7), pp.344-353.

[11]. Liu, L., Chen, F.C., Dorsey, J.L. and Hsieh, Y.H.P., 2006. Sensitive monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of porcine skeletal muscle in meat and feed products. Journal of food science, 71(1), pp.M1-M6.

[12]. Myers, M.J., Yancy, H.F., Farrell, D.E., Washington, J.D. and Frobish, R.A., 2005. Evaluation of two commercial lateral-flow test kits for detection of animal proteins in animal feed. Journal of food protection, 68(12), pp.2656-2664.

[13]. Hurley, I.P., Coleman, R.C., Ireland, H.E. and Williams, J.H., 2006. Use of sandwich IgG ELISA for the detection and quantification of adulteration of milk and soft cheese. International Dairy Journal, 16(7), pp.805-812.

[14]. Sass-Kiss, A. and Sass, M., 2002. Distribution of various peptides in citrus fruits (grapefruit, lemon, and orange). Journal of agricultural and food chemistry, 50(7), pp.2117-2120.

[15]. Chadseesuwan, U., Sangdokmai, A., Pimpitak, U., Puthong, S., Palaga, T., & Komolpis, K. 2016. Production of a monoclonal antibody against aflatoxin M1 and its application for detection of aflatoxin M1 in fortified milk. journal of food and drug analysis, 24(4), 780-787.

[16]. Navarro, P., Pérez, A. J., Gabaldón, J. A., Núñez-Delicado, E., Puchades, R., Maquieira, A., & Morais, S. 2013. Detection of chemical residues in tangerine juices by a duplex immunoassay. Talanta, 116, 33-38.

[17] Notermans, S., Dufrenne, J. and Soentoro, P.S., 1988. Detection of molds in nuts and spices: the mold colony count versus the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Journal of Food Science, 53(6), pp.1831-1833.

[۱۸]. اسعدی، ع.، مرتضوی، س.ع.، طباطبایی یزدی، ف. و شهیدی، ف. ۷۹۳۱. بررسی تکنیک الایزا و اهمیت کاربرد آن در صنایع غذایی. دومین همایش ملی دانش و فناوری علوم کشاورزی، منابع طبیعی و محیط زیست. ۱-۱۲.