

تعیین مقدار آفلاتوکسین M_1 در نمونه‌های شیر استان‌های زنجان، گیلان، آذربایجان شرقی و کرمانشاه به روش ELASA

حامد قویمی^۱، یاسمن تقوی^۱، فریناز اسمی^۲، جواد تاج‌کی^۳، سعید رضایی^۴، مهران محسنی^۵

^۱ گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

^۲ گروه بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

^۳ معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

^۴ گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

^۵ دانشیار شیمی مواد خوراکی و آب شناسی، گروه کنترل غذا و دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱۰/۲۰، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: آفلاتوکسین M_1 که به دنبال متابولیسم آفلاتوکسین B_1 که از طریق خوراک آلوده وارد بدن دام می‌شود، ایجاد می‌گردد. انسان‌ها نیز از طریق مصرف شیر دام آلوده در معرض مواجهه با این مایکوتوکسین قرار می‌گیرند. این مایکوتوکسین دارای اثرات هپاتوتوکسیک، سرطان‌زایی و موتاژنی بسیار قوی بوده و به‌طور بالقوه برای سلامتی انسان مخاطره‌آمیز می‌باشد. با توجه به این‌که شیر یکی از مواد غذایی مهم برای انسان به شمار می‌رود، بنابراین حصول اطمینان از سلامت شیر و عدم آلودگی آن با مواد مختلف از جمله آفلاتوکسین M_1 برای حفاظت از سلامت گروه‌های سنی مختلف امری ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۱۸۰ نمونه شیر اعم از سنتی و صنعتی از ۴ شهر تبریز، کرمانشاه، زنجان و رشت جمع‌آوری شده، نمونه‌ها سانتریفیوژ شده و چربی رویی آن برداشته شده و نمونه‌های شیر بدون چربی به روش ELISA رقابتی از نظر آفلاتوکسین M_1 مورد سنجش قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ۱۰۰٪ نمونه‌های مورد بررسی آلوده به آفلاتوکسین M_1 بودند؛ که میانگین غلظت آلودگی M_1 در شهر تبریز، کرمانشاه، زنجان و رشت به ترتیب $31/9 \pm 6/5$ ، $30/7 \pm 16/9$ ، $29/9 \pm 6/2$ و $25/4 \pm 3/8$ نانوگرم در لیتر در محدوده $1-134/2$ نانوگرم در لیتر به دست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه ما نشان داد که در تمامی نمونه‌های اخذ شده از چهار شهر تبریز، کرمانشاه، زنجان و رشت، آلودگی به آفلاتوکسین M_1 وجود دارد که سطح این آلودگی در فصل‌های مختلف متفاوت بود. به‌نحوی که بیشترین آلودگی در فصل پاییز و در نوع تولید سنتی، مشاهده شد. با توجه به مضرات آفلاتوکسین M_1 برای سلامت انسان، کنترل مداوم خوراک دام از لحاظ آفلاتوکسین B_1 و کنترل شیر و محصولات آن به جهت عدم حضور آفلاتوکسین M_1 بسیار مهم است.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین M_1 ، شیر سنتی و صنعتی، ELASA

مقدمه

یکی از مشکلات عمده‌ای که شیر و سایر محصولات لبنی را تهدید می‌کند، آلودگی با مایکوتوکسین‌ها است. مایکوتوکسین‌ها آلاینده‌های طبیعی و متابولیت‌های ثانویه سمی از کپک‌هایی هستند که عمدتاً توسط گونه‌های خاص مانند *آسپرژیلوس*، *پنی‌سیلیوم* و *آسپرژیلوس فوزاریوم* تحت شرایط مناسب دما و رطوبت تولید می‌شوند.^{۱،۲}

آفلاتوکسین‌ها از جمله مهم‌ترین مایکوتوکسین‌ها هستند که عمدتاً توسط گونه‌های مختلف *آسپرژیلوس* به‌ویژه *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* تولید می‌شوند.^۳ این سموم بسیار سمی، سرطان‌زا، جهش‌زا و تراutoژن بوده و همچنین به‌عنوان عامل هپاتیت کبدی و سرطان مجاری صفراوی خارج کبدی شناخته شده‌اند.^۴ آفلاتوکسین‌ها عمدتاً شامل چهار دسته G_2 , G_1 , B_2 , B_1 هستند.^{۴،۱} آلودگی مواد غذایی به مایکوتوکسین‌ها یک مشکل جهانی محسوب می‌شود و مطابق با آمار سازمان کشاورزی و غذای سازمان ملل متحد تقریباً ۲۵ درصد محصولات غذایی جهان آلوده به مایکوتوکسین‌ها هستند و طبق گزارش WHO مایکوتوکسین‌ها، به‌ویژه آفلاتوکسین یکی از عوامل مؤثر در بروز بیماری‌های ناشی از غذا می‌باشند.^۵ آفلاتوکسین B_1 بیشتر از بقیه آفلاتوکسین‌ها در مواد غذایی وجود دارد.^۲ که توسط IARC در لیست عوامل سرطان‌زای گروه ۱ برای انسان قرار گرفته است.^۶ خاصیت سرطان‌زایی، جهش‌زایی و سمیت آفلاتوکسین M_1 مشابه آفلاتوکسین B_1 است.^۷ در طی آزمایش‌های فراوان که توسط WHO/FAO تأیید شده است، آفلاتوکسین M_1 و B_1 دارای خاصیت هپاتوتوکسیک، موتاژنیک و کارسینوژنیک می‌باشند. علاوه بر ایجاد برخی سرطان‌ها، آفلاتوکسین‌ها سیستم ایمنی بدن انسان را سرکوب می‌کنند و سمیت

سایر ترکیبات کبدی را تقویت می‌کنند. شایان ذکر است که حضور آفلاتوکسین در علوفه یا غذا گاو و گوسفند موجب اختلال در دستگاه گوارش و فعالیت سیستم ایمنی، کاهش تولید مثل، کاهش تولید شیر، کم خونی، یرقان و کاهش رشد دام می‌گردد.^۸ رابطه نزدیکی بین مقدار آفلاتوکسین B_1 موجود در مواد غذایی و افزایش ریسک سرطان کبد وجود دارد.^۹ حد مجاز غلظت آفلاتوکسین در کشورهای مختلف، متفاوت هست. براساس استاندارد ایران و اتحادیه اروپا حد مجاز آفلاتوکسین M_1 در شیر ۵۰ نانوگرم در لیتر تعیین شده است.^{۱۱،۱۰} آفلاتوکسین‌ها در طیف وسیعی از مواد غذایی نظیر غلات از جمله جو، برنج، ذرت، گندم و فراورده‌های آن‌ها، مغزهای درختی، انجیر خشک، شیر، تخم‌مرغ، پنیر، ماست، سوسیس‌های تخمیری، گوشت‌های عمل‌آوری شده و ... مشاهده شده‌اند.^۵ همچنین بسیاری از محصولات کشاورزی که در تهیه خوراک دام مصرف می‌شوند مستعد آلودگی با گونه‌های *آسپرژیلوس* هستند که قادرند متابولیت‌های سمی و ماندگار در غذا را تولید بکنند. شیر یکی از مواد غذایی است که منشأ حیوانی دارد و ممکن اسن آلودگی با آفلاتوکسین در شیر ناشی از منبع تغذیه حیوان باشد. آلودگی شیر و سایر فراورده‌های لبنی به آفلاتوکسین یک خطر بالقوه برای سلامت انسان خصوصاً در گروه سنی کودک، سالمند و زنان باردار در نظر گرفته می‌شود. در صورت تغذیه دام با علوفه آلوده به آفلاتوکسین B_1 ، این سم در بدن حیوان هیدروکسیله و به نوع آفلاتوکسین M_1 تبدیل می‌شود که در شیر و سایر محصولات لبنی یافت می‌گردد. یکی از این موارد که آفلاتوکسین M_1 را حائز اهمیت می‌کند، عدم حذف آن در طول فرآیندهای سالم‌سازی حرارتی مانند پاستوریزاسیون و استرلیزاسیون می‌باشد.^{۱۲-۱۴}

research mode Essay- Persia ساخت شرکت Heidolph آلمان، Magnetic stirrer ساخت شرکت Heidolph آلمان مدل unimaylelo، اولترا سانتریفیوژ Beckman آمریکا، هموژنایزر مدل Ho4AP ساخت Edmund Buhler آلمان، دستگاه (AWARE NESS usA stat fax -2100) ELISA plate reader (AWARE NESS usA stat fax -2600) ELISA Plate Washer و کیت الایزای آفلاتوکسین M_1 ، ساخت شرکت Bioassay technology laboratory کشور چین حاوی (دو عدد میکروپلیت با تعداد ۹۶ چاهک، محلول بافر جهت رقیق‌سازی، شش عدد ویال استاندارد آفلاتوکسین M_1 ، ویال محلول پادتن، حاوی محلول ضد آفلاتوکسین M_1 ، ویال محلول کونژوگه حاوی پراکسیدکونژوگه شده با آفلاتوکسین M_1 ، ویال کروموژن، حاوی تترا متیل بنزیدین، ویال متوقف کننده، حاوی اسیدسولفوریک نرمال، یک عدد محلول بافر شستشو)

روش کار

جهت آماده‌سازی، نمونه‌ها ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش از فریزر به یخچال انتقال داده شد تا به تدریج و در دمای ۲-۸ درجه سانتی‌گراد از حالت انجماد خارج شوند. نمونه‌های شیر توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید؛ سپس از لایه‌ی بالایی بدون چربی شیر (skimmed milk)، با استفاده از پیپت پاستور برداشته شد و با کیت الایزای آفلاتوکسین M_1 ، با محدوده‌ی اندازه‌گیری ۰/۱-۸/۱ میکروگرم در کیلوگرم، مورد آنالیز قرار گرفت. اساس این آزمایش بر پایه واکنش ایمنوآفینیتی رقابتی بین آنتی‌بادی آفلاتوکسین M_1 و آنتی‌ژن موجود در نمونه شیر یا استاندارد می‌باشد.

مایکوتوکسین‌ها از خطرناک‌ترین آلاینده‌های مواد غذایی هستند که برای تجزیه و تحلیل کمی آن‌ها به یک روش قابل اعتماد نیاز است^{۱۵}. به همین دلیل تعیین مقدار آفلاتوکسین M_1 در شیر و محصولات آن به منظور افزایش کیفیت شیر و حفظ سلامت مصرف‌کنندگان در گروه‌های سنی مختلف، حائز اهمیت می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق تعیین مقدار آفلاتوکسین M_1 در نمونه‌های شیر تهیه شده به روش سنتی و صنعتی در چهار استان غربی کشور طی تمام فصول یک سال به روش ELISA می‌باشد تا مقایسه‌ای بر اثرات روش فراهمی شیر همچنین روش‌های دامداری متفاوت و تاثیر فصل بر شدت آلودگی نمونه‌های شیر به آفلاتوکسین M_1 ارائه گردد.

روش نمونه‌برداری

در این مطالعه ۱۸۰ نمونه شیر (۹۳ نمونه شیر سنتی و ۸۷ نمونه شیر صنعتی) از چهار استان زنجان، گیلان، آذربایجان شرقی و کرمانشاه در فصول پاییز و زمستان سال ۹۷ و فصول بهار و تابستان سال ۹۸ جمع‌آوری شدند. که شیرهای محلی از لبنیاتی‌های مناطق مختلف، در روزهای مختلف تهیه و شیر پاستوریزه هم از دو کارخانه لبنی مختلف با سری ساخت متفاوت موجود در فروشگاه‌های سطح شهر استان‌های منتخب در روزهای مختلف خریداری شد.

از نمونه‌های تهیه‌شده، به مقدار موردنیاز (۲۰ میلی‌لیتر) برای آزمایش در ظروف استریل ریخته و در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمون نگهداری شد.

مواد و تجهیزات

در این کار از ترازوی دیجیتالی CR-200 ساخت شرکت AND ژاپن، vortex micture مدل

منجر به یک تغییر رنگ از آبی به زرد گردید. در نهایت میزان جذب نور در طول موج ۴۵۰ نانومتر در مقابل شاهد هوا توسط دستگاه الایزا ریدر اندازه گرفته شد.

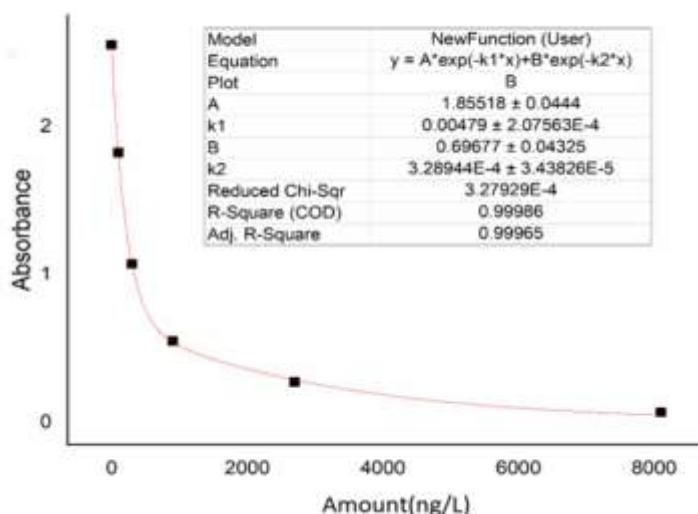
روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های به دست آمده توسط دستگاه ELISA reader با استفاده از نرم افزار SPSS مورد مطالعه آماری قرار گرفت. برای بررسی معنی دار بودن اختلاف بین گروه‌ها از تست GLM-ANOVA و Post Tukey test استفاده شد.

رسم منحنی کالیبراسیون

برای رسم منحنی از ۶ نمونه محلول استاندارد موجود در کیت با غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۳، ۰/۹، ۲/۷ و ۸/۱ میکروگرم در کیلوگرم، استفاده گردید. نمودار ۱، منحنی استاندارد تهیه شده برای اندازه گیری آفلاتوکسین M_1 در شیر را نشان می‌دهد.

۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از محلول‌های استاندارد و نمونه‌های آماده سازی شده، به طور جداگانه در حفره‌های میکروپلیت اضافه، به آرامی مخلوط و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و محل تاریک انکوبه شدند. شست و شو با الایزا واکسر در دو مرحله انجام شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول رقیق شده کونژوگه آنزیم به حفره‌ها اضافه شد، به آرامی مخلوط و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و محل تاریک انکوبه گردید. در این مرحله آفلاتوکسین M_1 آزاد و کونژوگه جهت باند شدن با جایگاه‌های اتصال پادتن‌های آفلاتوکسین با یکدیگر رقابت می‌کنند. عمل شست و شو در دو مرحله انجام شد. در ادامه ۵۰ میکرو لیتر از سوبسترا و ۵۰ میکرو لیتر از محلول کروموژن به هر یک از حفره‌ها اضافه و به آرامی مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در محل تاریک انکوبه شد. در این مرحله کونژوگه آنزیمی باند شده، محلول کروموژن بدون رنگ را به محصولی با رنگ آبی تبدیل کرد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول متوقف کننده به هر یک از حفره‌ها اضافه و مخلوط شد. در این مرحله محلول متوقف کننده



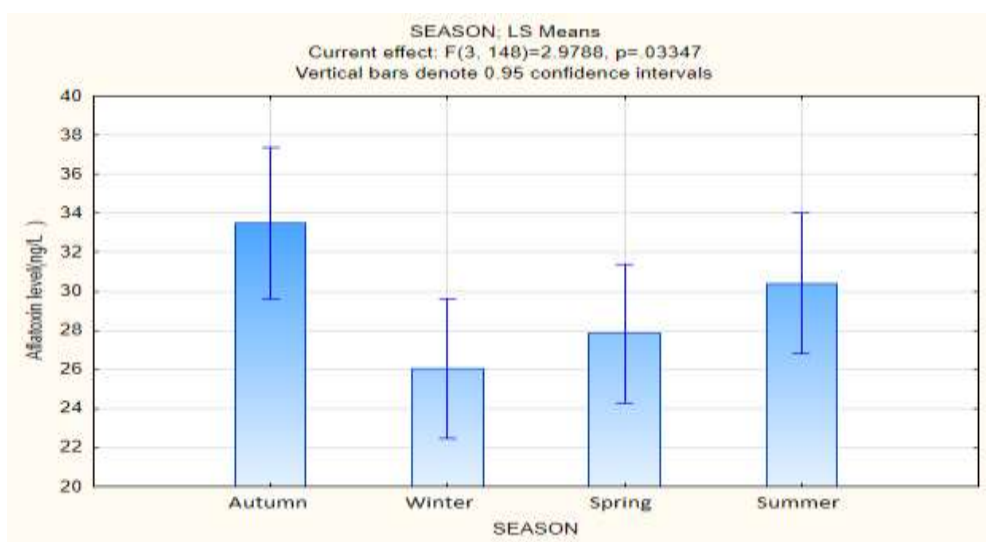
نمودار ۱: منحنی کالیبراسیون آفلاتوکسین M_1 ، کیت الایزا

یافته‌ها

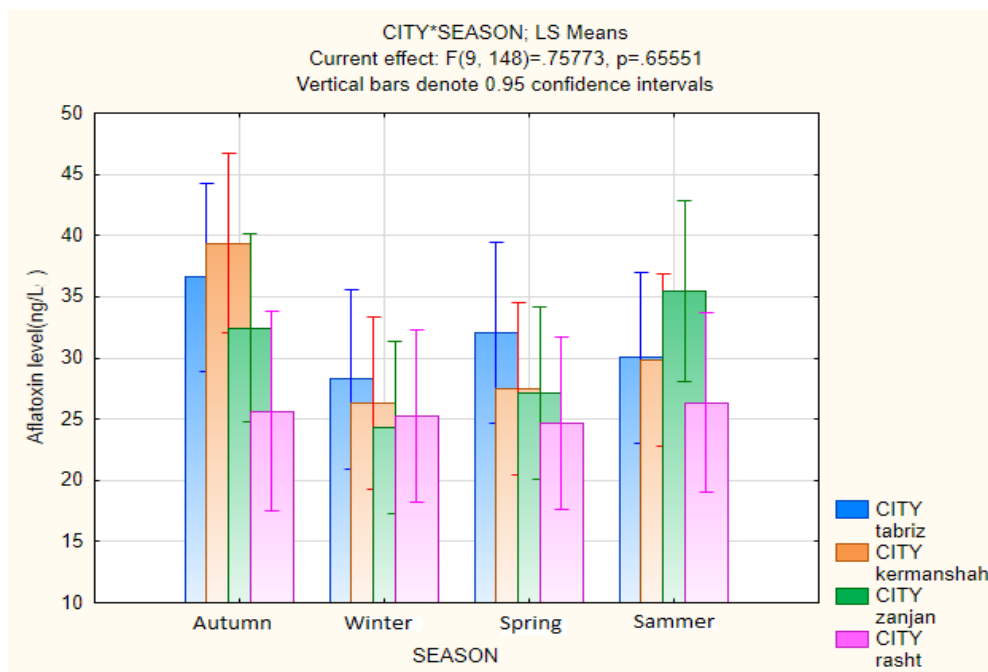
در این مطالعه، ۱۸۰ نمونه از ۴ شهر تبریز، کرمانشاه، زنجان و رشت جمع‌آوری شد که به روش الایزا، سطح آفلاتوکسین M₁ در آن‌ها بررسی گردید. میانگین غلظت آلودگی نمونه با آفلاتوکسین M₁ در شهر تبریز، کرمانشاه، زنجان و رشت به ترتیب با میانگین کلی 31.9 ± 6.5 ، 30.7 ± 16.9 ، 29.9 ± 6.2 و 25.4 ± 3.8 نانوگرم در لیتر به دست آمد (نمودار ۲). نتایج این مطالعه نشان داد که تفاوت آلودگی در فصل‌های مختلف به تفکیک شهرها معنی‌دار نبوده

است ($P=0.6555$). اطلاعات کامل‌تر در جدول ۱ به تفصیل آورده شده است.

غلظت آفلاتوکسین M₁ در نمونه‌های شیر به ترتیب در بهار، تابستان، پاییز و زمستان به ترتیب 27.3 ± 6.12 ، 26.7 ± 5.7 و 32.2 ± 18.2 و 26.3 ± 5.7 نانوگرم در لیتر، به دست آمد (نمودار ۳). نتایج این مطالعه نشان از تفاوت بین محتوای آفلاتوکسین بر اساس فصل‌های مختلف سال، در فصول پاییز و زمستان باهم اختلاف معنی‌دار داشتند ($P<0.05$ یا $P=0.334$).



نمودار ۲: میزان آفلاتوکسین M₁ در نمونه‌ها بر اساس فصل‌های مختلف سال در شهرهای مورد مطالعه



نمودار ۳: میزان آفلاتوکسین M_1 در نمونه‌ها بر اساس فصل‌های مختلف سال

و $26/4 \pm 6$ نانوگرم در لیتر به دست آمد (تفاوت معنی‌دار بود
($P=0/0346$). اطلاعات کامل‌تر در جدول ۲ آورده شده است.

میزان آفلاتوکسین M_1 از نظر نحوه‌ی تولید، در نمونه‌های
سستی و صنعتی به ترتیب دارای میانگین آلودگی $29/7 \pm 13/2$

جدول ۱: میانگین و محدوده‌ی آلودگی نمونه‌ها به آفاتوکسین M_1 به تفکیک شهر و فصل

شهر	فصل	تعداد نمونه	محدوده (نانوگرم در لیتر)	میانگین (نانوگرم در لیتر)	میانگین کل (نانوگرم در لیتر)	درصد نمونه‌های بالاتر از ۵۰ (نانوگرم در لیتر)
تبریز	بهار	۴۳	۲۰/۰-۵۶/۳	۳۱/۵±۷/۶	۳۱/۹±۶/۵	۲/۳
	تابستان			۳۰/۰±۶/۹		
	پاییز			۳۶/۵±۸/۰		
	زمستان			۲۸/۳±۸/۶		
	تولید سنتی			۳۳/۳±۶/۷		
	تولید صنعتی			۳۰/۹±۷/۲		
کرمانشاه	بهار	۴۶	۲/۶-۱۳۴/۲	۲۷/۴±۲/۷	۳۰/۷±۱۶/۹	۲/۱
	تابستان			۲۹/۹±۳/۵		
	پاییز			۳۹/۴±۳۱/۴		
	زمستان			۲۶/۳±۹/۶		
	تولید سنتی			۳۱/۶±۱۷/۷		
	تولید صنعتی			۲۹/۸±۶/۳		
زنجان	بهار	۴۶	<۰/۱-۵۶/۳	۲۷/۱±۴/۷	۲۹/۹±۶/۲	۲/۱
	تابستان			۳۶/۲±۴/۵		
	پاییز			۳۴/۴±۸/۷		
	زمستان			۲۴/۳±۴/۱		
	تولید سنتی			۳۴/۱±۶/۳		
	تولید صنعتی			۲۵/۹±۴/۵		
رشت	بهار	۴۵	۱۱/۰-۳۲/۹	۲۴/۶±۵/۷	۲۵/۴±۳/۸	۰
	تابستان			۲۶/۳±۴/۱		
	پاییز			۲۵/۶±۲/۵		
	زمستان			۲۵/۲±۳/۲		
	تولید سنتی			۲۶/۶±۳/۹		
	تولید صنعتی			۲۴/۳±۳/۸		
کلی	کل نمونه‌ها	۱۸۰	<۱-۱۳۴/۲	--	۲۸/۱-۱۰/۵	۱/۶

جدول ۲: میانگین و محدوده‌ی آلودگی نمونه‌ها به آفلاتوکسین M₁ به تفکیک سنتی و صنعتی

نحوه‌ی تولید	شهرها	فصول	میانگین (نانوگرم در لیتر)	تعداد نمونه	محدوده (نانوگرم در لیتر)	میانگین کل (نانوگرم در لیتر)
سنتی	تبریز	بهار	۳۶/۶±۵/۹	۳۳/۰±۵/۸	<۰/۱-۱۳۴/۲	۲۹/۷±۱۳/۲
		تابستان	۳۲/۴±۴/۰			
		پاییز	۳۵/۴±۴/۹			
		زمستان	۲۷/۲±۴/۳			
	کرمانشاه	بهار	۲۶/۲±۶/۸	۳۱/۹±۲۳/۱		
		تابستان	۲۴/۹±۳/۳			
		پاییز	۴۵/۷±۵۰/۰			
		زمستان	۳۳/۲±۳/۹			
	زنجان	بهار	۲۹/۸±۱/۱	۲۷/۲±۱۱/۰		
		تابستان	۲۴/۹±۱۲/۷			
		پاییز	۲۹/۱±۱۸/۳			
		زمستان	۲۴/۹±۵/۵			
	رشت	بهار	۲۷/۸±۲/۰	۲۶/۹±۲/۸		
		تابستان	۲۷/۳±۳/۴۵			
		پاییز	۲۶/۴±۳/۷۶			
		زمستان	۲۶/۲±۲/۱			
صنعتی	تبریز	بهار	۲۵/۲±۳/۵	۳۰/۶±۶/۹	۲/۶-۵۶/۳	۲۶/۴±۶
		تابستان	۳۰/۸±۳/۵			
		پاییز	۳۷/۶±۱۰/۵			
		زمستان	۲۹/۱±۱/۶			
	کرمانشاه	بهار	۲۶/۵±۱/۶	۲۵/۸±۶/۴		
		تابستان	۲۳/۳±۴/۰			
		پاییز	۳۱/۱±۳/۰			
		زمستان	۲۳/۳±۱۰/۶			
	زنجان	بهار	۲۴/۳±۵/۴	۲۵/۳±۴/۱		
		تابستان	۲۴/۷±۵/۱			
		پاییز	۲۸/۵±۱/۸			
		زمستان	۲۳/۶±۲/۴			
	رشت	بهار	۲۱/۳±۶/۵	۲۳/۸±۴/۳		
		تابستان	۲۵/۱±۲/۳			
		پاییز	۲۶/۶±۲/۴			
		زمستان	۲۲/۸±۲/۷			

بحث

در مطالعه حاضر، ما به بررسی ۱۸۰ نمونه شیر، از ۴ شهر مختلف تبریز، کرمانشاه، زنجان و رشت پرداختیم. بیشترین میزان آلودگی به آفاتوکسین M_1 در شهر تبریز و کمترین میزان در رشت دیده شد. همچنین از نظر فصلی بیشترین و کمترین آلودگی به آفاتوکسین M_1 در فصل پاییز و زمستان بود؛ که اختلاف معنی‌داری از نظر تفاوت در میزان آفاتوکسین M_1 وجود داشت. از نظر نوع تولید نیز، شیرهای تولیدشده به روش سنتی، میزان آلودگی به آفاتوکسین M_1 بیشتری داشتند که اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود. بیشترین و کمترین میزان آفاتوکسین M_1 در هر دو نوع تولیدات سنتی و صنعتی به ترتیب مربوط به تبریز و رشت گزارش شد. این نتایج می‌تواند حاکی از تفاوت آب و هوایی این دو شهر و دسترسی بیشتر دام به علوفه تازه در شهر رشت و در نهایت آلودگی کمتر به آفاتوکسین M_1 باشد.

آلودگی نمونه‌های شیر به آفاتوکسین M_1 در شهرهای تبریز، کرمانشاه، زنجان و رشت، در محدوده‌ی کمتر از حد مجاز توصیه‌شده توسط اتحادیه‌ی اروپا و ایران قرار دارند. هرچند که میزان آلودگی نمونه‌ها به آفاتوکسین M_1 در فصول مختلف سال، دچار تغییر می‌گردند، به‌نحوی که در فصول سرد سال و عمدتاً فصل پاییز، شاهد بیشترین آلودگی با آفاتوکسین M_1 بودیم. ۱۰۰٪ نمونه‌های شیر خام مورد مطالعه آلوده به آفاتوکسین M_1 و ۱/۶٪ از نمونه‌ها دارای غلظت آفاتوکسین بالاتر از حد مجاز تعیین‌شده توسط سازمان استاندارد ایران و اروپا که ۵۰ نانوگرم در لیتر می‌باشد بودند. محدوده‌ی آلودگی به آفاتوکسین M_1 میان کل نمونه‌های مورد مطالعه، ۱۳۴/۲-۱ < نانوگرم در لیتر به دست آمد.

مطالعات مختلفی در سرتاسر ایران انجام شده است و آلودگی به آفاتوکسین M_1 در ۱۰۰٪ نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده از اهواز، شیراز، تهران و اراک مشاهده شد^{۱۶}. که نتایج همسو با مطالعه‌ی ما بود. اما در مطالعه‌ی موثق و

همکاران که بر روی نمونه‌های شیر سنتی در شهر میاندوآب انجام شد، ۵۰ درصد نمونه‌ها آلوده به آفاتوکسین M_1 بوده و آلودگی بالاتر از حد مجاز در هیچ‌یک از نمونه‌ها مشاهده نشد^{۱۷}. در مطالعه‌ای دیگر در ۱۱۷ شهر ایران که بر روی نمونه‌های شیر انجام شده است. نشان داد میزان آفاتوکسین M_1 در ۵۴٪ از نمونه‌ها حضور و در ۰/۶٪ از موارد، از حد مجاز فراتر بود^{۱۸}. در خراسان رضوی نیز میزان آلودگی به آفاتوکسین M_1 ، ۴۰٪ به دست آمد^{۱۹}. که آلودگی پایین‌تری نسبت به مطالعه‌ی ما گزارش شد. و بالعکس در مطالعه‌ی سفیدگر و همکاران در شهر بابل ۵۷ درصد نمونه‌ها دارای آلودگی به آفاتوکسین M_1 در سطح بالاتر از حد مجاز بودند. علت این آلودگی از دید محققین، ذخیره مواد غذایی در مدت طولانی در محیط مرطوب و تهویه نامناسب بود که شرایط رشد انواع قارچ‌ها از جمله آفاتوکسین‌ها را فراهم می‌کند^{۲۰}.

کامکار و همکارانش نیز در شهر سراب ۱۱۱ نمونه شیر را مورد بررسی قرار دادند که ۷۶/۶٪ از نمونه‌ها آلوده آفاتوکسین M_1 در محدوده‌ی ۲۸۰-۱۵ نانوگرم در لیتر بود؛ که در ۴۰٪ نمونه‌ها بالاتر از حد مجاز اتحادیه‌ی اروپا گزارش شد. همچنین میزان آلودگی در فصول پاییز و زمستان بیشتر از فصول بهار و تابستان و دارای اختلاف معنی‌دار بودند^{۲۱}. فراوانی آلودگی در این مطالعه کمتر از مطالعه‌ی حاضر بود ولی درصد آلودگی بالاتر از حد مجاز بوده و محدوده‌ی آلودگی، نسبت به مطالعه‌ی ما بیشتر بود. به‌علاوه از نظر نتایج بررسی فصلی، همانند مطالعه‌ی ما میزان آلودگی در فصل پاییز بیشتر از سایر فصول بود.

در دیگر کشورها نیز، مطالعات مختلفی مبنی بر میزان آلودگی شیر به آفاتوکسین M_1 انجام شده است. به‌عنوان مثال، در مطالعه‌ای در کشور چین انجام شد، میزان آلودگی آفاتوکسین M_1 ، ۱۰۰٪ گزارش شد و ۲۹٪ نمونه‌ها، آلودگی بیشتر از حد مجاز (۵۰ نانوگرم در لیتر) داشتند^{۲۲}. در مطالعه‌ای

غذایی مصرفی گاوهای شیری می‌باشد. همچنین آگاه‌سازی دامداران در مورد این مایکوتوکسین و کاهش زمینه‌های تولید آن، ارزیابی مستمر خوراک و علوفه دام از نظر میزان آلودگی به آفلاتوکسین B₁، بررسی دوره‌ای شیرها از نظر آلودگی به آفلاتوکسین M₁، انجام مطالعاتی با تعداد نمونه‌های بیشتر و بررسی شیرهای تولیدی همه کارخانه‌های لبنی و بررسی میزان آفلاتوکسین‌ها در دیگر مواد لبنی نظیر پنیر، ماست و کشک، برای کاهش آلودگی اولیه در شیرها و سایر محصولات لبنی برای کاهش آلودگی اولیه و از این‌رو بررسی و اندازه‌گیری میزان M₁ به‌تنهایی و با توجه به اثر سینرژیستی آن‌ها در کنار سایر مایکوتوکسین‌ها، در شیر و سایر مواد غذایی توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

از بین ۱۸۰ نمونه مورد بررسی از ۴ شهر مختلف، بیشترین میزان آلودگی به آفلاتوکسین M₁ در شهر تبریز و کمترین میزان در رشت با میانگین $31/9 \pm 6/5$ و $25/4 \pm 3/8$ نانوگرم در لیتر، دیده شد. همچنین از نظر فصلی بیشترین و کمترین آلودگی به آفلاتوکسین M₁ در فصل پاییز و زمستان مشاهده شد.

تفاوت در میزان آلودگی شیر خام به آفلاتوکسین M₁ بین ایران و سایر کشورها، می‌تواند مربوط به ناحیه جغرافیایی و شرایط آب و هوایی، فصل مطالعه، تعداد نمونه، روش‌های مختلف سنجش توکسین، سیستم‌های مختلف پرورش دام‌ها و سیستم‌های گوناگون فرآوری شیر باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و سپاس خود را از معاونت غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی زنجان که پشتیبان مالی طرح تحقیقاتی با شماره A-12-934-6 و کد اخلاق IR.ZUMS.REC.1397.160 بودند قدردانی می‌نماید.

در برزیل دیده شد که ۱۰۰٪ نمونه‌ها آلوده به آفلاتوکسین بودند و ۱۰٪ آن‌ها، دارای غلظت بالای ۵۰ نانوگرم در لیتر بودند^{۲۳}. در مطالعه‌ای در ترکیه، میزان آلودگی در نمونه‌ها، ۳۰٪ مشاهده شد؛ و ۱۷٪ از نمونه‌ها، آلودگی بیشتر از حد مجاز داشتند^{۲۴}. در برخی کشورهای دیگر نیز، از جمله مراکش^{۲۵}، پاکستان^{۲۶}، آرژانتین^{۲۷} و لبنان^{۲۸}، میزان آلودگی به ترتیب ۲۷٪، ۷۱٪، ۳۹٪ و ۲۱٪ و میزان آلودگی بیشتر از حد مجاز در ۸٪، ۵۸٪، ۷/۵٪ و ۲۰/۷٪ از نمونه‌ها گزارش شده است.

دلایل بسیاری برای افت کیفیت شیر به لحاظ بار آلودگی به آفلاتوکسین در فصول سرد سال مطرح است. یکی از دلایل اصلی آن استفاده از علوفه‌های انبارشده و خشک در تغذیه دام‌ها و عدم رعایت استانداردهای لازم برای انبار علوفه است. مطالعات قبلی نشان از تنوع فصلی آلودگی شیر به آفلاتوکسین M₁ و بروز بالاتر این آلودگی در طی فصل پاییز داشتند که بامطالعه ما هم‌خوانی دارند^{۲۱}. دوم این‌که در این ماه دسترسی به علوفه تازه امکان‌پذیر نیست و دامداران محلی از نان خشک جهت تغذیه دام‌های خود استفاده می‌کنند، درحالی‌که در فصل بهار بیشتر از علوفه تازه استفاده می‌کنند.

بااین‌حال علی‌رغم استفاده از استراتژی‌های پیشگیرانه در برابر رشد قارچ و حذف آفلاتوکسین‌ها، آلودگی مواد غذایی و متعاقب آن شیر، گاهی اوقات غیرممکن به نظر می‌رسد. روش‌های زیادی برای کاهش آفلاتوکسین M₁ در شیر بیان‌شده‌اند، تجزیه آفلاتوکسین M₁ با کمک روش‌های ترکیبی مثل اشعه ماورای بنفش، امواج ماکروویو، اشعه گاما و ترکیبات جاذب هم انجام‌شده است. برخی تست‌های آزمایشگاهی نشان دادند که ترکیبات جاذب مختلفی هم چون آلومین‌ها، سیلیکات‌ها و آلومینوسیلیکات‌ها قادرند به آفلاتوکسین‌ها متصل شده و موجب دفع آن‌ها از بدن گردند. متأسفانه در رابطه با تأثیر این ترکیبات جاذب بر روی اجزای شیر اطلاعات زیادی در دسترس نمی‌باشد. بااین‌حال بهترین راه برای حذف مستقیم آلودگی شیر با آفلاتوکسین M₁ جلوگیری از آلودگی اولیه مواد

References

1. Fallah AA. Assessment of aflatoxin M₁ contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. *Food Chemical Toxicology*. 2010;48(3): 988-91.
2. Lee JE, Kwak B-M, Ahn J-H, Jeon T-H. Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk in South Korea using an immunoaffinity column and liquid chromatography. *Food Control*. 2009;20(2): 136-8.
3. Fani Makki O, Afzali N, Omid A. Effect of milk thistle on the immune system, intestinal related variables, appearance and mortality of broilers contaminated with Aflatoxin B₁. *Medicinal Herbs*. 2013;4(1): 33-8.
4. Fallah AA, Rahnama M, Jafari T, et al. Seasonal variation of aflatoxin M₁ contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. *Food Control*. 2011;22(10): 1653-6.
5. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, et al. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;80(5): 22-1106.
6. Humans IWGotEoCRt, Cancer IAfRo, Organization WH. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins: IARC Monographs on the Evaluat; 1993.
7. Klein PJ, Van Vleet TR, Hall JO, Coulombe Jr RA. Effects of dietary butylated hydroxytoluene on aflatoxin B₁-relevant metabolic enzymes in turkeys. *Food chemical toxicology*. 2003;41(5): 671-8.
8. Hsieh D, Cullen J, Ruebner B. Comparative hepatocarcinogenicity of aflatoxins B₁ and M₁ in the rat. *Food chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 1984;22(12): 8-1027.
9. Kim E, Shon D, Ryu D, et al. Occurrence of aflatoxin M₁ in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. *Food Additives Contaminants*. 2000;17(1): 59-64.
10. Lin L-C, Liu F-M, Fu Y-M, Shih D-C. Survey of aflatoxin M₁ contamination of dairy products in Taiwan. *Journal of Food Drug Analysis*. 2004;12(2): 8.
11. Lopez C, Ramos L, Bulacio L, et al. Aflatoxin B₁ content in patients with hepatic diseases. *Medicina-buenos aires*. 2002;62(4): 313-6.
12. Amoli-Diva M, Taherimaslak Z, Allahyari M, et al. Application of dispersive liquid-liquid microextraction coupled with vortex-assisted hydrophobic magnetic nanoparticles based solid-phase extraction for determination of aflatoxin M₁ in milk samples by sensitive micelle enhanced spectrofluorimetry. *Talanta* 2015;134: 98-104.
13. Berg T. How to establish international limits for mycotoxins in food and feed? *Food Control*. 2003;14(4): 24-219
14. Cadirci O. Aflatoxin M, Contamination of Ice Cream in Samsun, Turkey *Animal Veterinary Advances*. 2011;10(15): 2047-50.
15. Esmi F, Khoshnamvand Z, Nazari F, et al. Ochratoxin A in chamomile, black and green tea and human health risk assessment in Iranian population. 2022;16(6): 5066-5076
16. Sadeghi E, Mohammadi M, Sadeghi M, Mohammadi R. Systematic review study of Aflatoxin M₁ level in raw, pasteurized and UHT milk in Iran. *Iranian Journal of Nutrition Sciences Food Technology*. 2013;7(5): 599-612.
17. Movassagh M, Khodabandehloo E, Movassagh A. Detection of aflatoxin M₁ in cow's raw milk in Miandoab city, West Aazerbaijan province, Iran. *Global Veterinaria*. 2011;6(3): 313-15.
18. Khaneghahi Abyaneh H, Bahonar A, Noori N, et al. Aflatoxin M₁ in raw, pasteurized and UHT milk marketed in Iran. *Food additives contaminants: part B*. 2019;12(4): 236-44.
19. Hajmohammadi M, Valizadeh R, Naserian A, et al. Composition and occurrence of aflatoxin M₁ in cow's milk samples from Razavi Khorasan Province, Iran. *International Journal of Dairy Technology*. 2020;73(1): 5-40.
20. Sefidgar S, Mirzaei M, Hadizadeh Moallem S, Azarmi M. The comparison of aflatoxin M₁ in pasteurized milk in winter and summer seasons in Babol. *Babol Univ Med Sci*. 2007;9(5): 27-31.
21. Kamkar A. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food control*. 2005;16(7): 593-9.
22. Guo L, Zheng N, Zhang Y, et al. A survey of seasonal variations of aflatoxin M₁ in raw milk in Tangshan region of China during 2012–2014. *Food Control*. 2016;69: 30-5.
23. Santili ABN, de Camargo AC, Nunes RdSR, et al. Aflatoxin M₁ in raw milk from different regions of São

- Paulo state–Brazil. Food Additivesm Contaminants: Part B. 2015;8(3): 207-14.
24. Golge O. A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Adana province of Turkey. Food Control. 2014;45: 150-5.
25. El Marnissi B, Belkhou R, Morgavi DP, et al. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk collected from traditional dairies in Morocco. Food Chemical Toxicology. 2012;50(8):21-2819.
26. Iqbal SZ ,Asi MR. Assessment of aflatoxin M1 in milk and milk products from Punjab, Pakistan. Food control. 2013;30(1): 235-9.
27. Michlig N, Signorini M, Gaggiotti M, et al. Risk factors associated with the presence of aflatoxin M1 in raw bulk milk from Argentina. Food Control. 2016;64: 151-6.
28. Hassan HF, Kassaify Z. The risks associated with aflatoxins M1 occurrence in Lebanese dairy products. Food Control. 2014;37: 68-72.

Determination of aflatoxin M₁ in milk samples of Zanjan, Gilan, East Azerbaijan and Kermanshah provinces by ELISA method

Hamed Ghavimi¹, Yasaman Taghavi ¹, Farinaz Esmi ², Javad Tajkey³, Saeed Rezaei⁴,
Mehran Mohseni ⁵

¹Department of Toxicology, Department of Toxicology and Pharmacology, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical sciences, Zanjan, Iran

²Department of Food Safety and Hygiene, School of Public Health, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

³ Department of Pharmacology, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences

⁴ Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences

⁵ Associate Professor of Food Chemistry and Medical Hydrology, Department of Food and drug Control, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences

Email: ghavimih@zums.ac.ir

Received: 10 January 2024 , Accepted: 5 February 2024

ABSTRACT

Background: Aflatoxin M₁ is one of mycotoxins which is produced by metabolism of Aflatoxin B₁ and enters to the human body through animal milk. It has very strong hepatotoxic, carcinogenic and mutagenic effects and is potentially dangerous for human health. As milk is one of the most important foods for humans, it is essential to protect the health risk of Aflatoxin M₁ in different age groups. In the present study, raw and pasteurized milk samples of Zanjan, East Azerbaijan, Gilan and Kermanshah provinces have been evaluated then contamination of the samples with aflatoxin M₁ and also the status of this contamination in different seasons have been investigated.

Methods: 180 samples (93 samples of raw milk and 87 samples of pasteurized milk) In the autumn and winter of 1997 and the spring and summer of 1998 were collected from stores in Zanjan, East Azarbaijan, Gilan and Kermanshah provinces. The samples were centrifuged, the surface fat removed, and competitive ELISA assessed for aflatoxin M₁.

Results: In this study, 180 samples were collected from 4 cities of Tabriz, Kermanshah, Zanjan and Rasht, where the level of aflatoxin M₁ was measured by ELISA method. The results showed that 100% of the examined samples were infected with aflatoxin M₁ and the average concentration aflatoxin M₁ in Tabriz, Kermanshah, Zanjan and Rasht are 31.9±6.5, 30.7±16.9, 29.9±2.2 and 25.4±3.8 ng/L, that was observed in the range of <1-134.2 ng/liter.

Conclusion: The results of our study showed that in all samples taken from four cities of Tabriz, Kermanshah, Zanjan and Rasht, there is aflatoxin M₁ contamination that the level of this contamination was different from season to season. In such a way, the highest contamination was observed in the autumn and in the traditional type of production. Considering the harmfulness of aflatoxin M₁ for human health, it is very important to continuously control animal feed in terms of aflatoxin B₁ and control milk and its products for the absence of aflatoxin M₁.

Keywords: Aflatoxin M₁, Raw milk, Pasteurized milk, ELISA