مجله مهندسی بهداشت محیط، پاییز ۱۴۰۲، سال ۱۱، شماره ۱ : ۷۶-۸۸

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

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، ایران

[۳] معاونت غذا و داروی 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 به‌دنبال متابولیسم آفلاتوکسین B_1 که از طریق خوراک آلوده وارد بدن دام می شود،ایجاد می گردد. 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 ازجمله آفلاتوکسین M_1 برای حفاظت از سلامت گروه‌های سنی مختلف امری ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش ها: در این مطالعه ۱۸۰ نمونه شیر اعم از سنتی و صنعتی از ۴ شهر تبریز، کرمانشاه، زنجان و رشت جمع‌آوری‌شده، نمونه‌ها سانتریفیوژ شده و چربی رویی آن برداشته‌شده و نمونه‌های شیر بدون چربی به روش ELISA رقابتی ازنظر آفلاتوکسین M_1 موردسنجش قرار گرفتند.

یافته ها: نتایج نشان داد که ٪۱۰۰ نمونه‌های موردبررسی آلوده به آفلاتوکسین M_1 بودند؛ که میانگین غلظت آلودگی M_1 در شهر تبریز، کرمانشاه، زنجان و رشت به ترتیب ۶/۵±۳۱/۹، ۱۶/۹±۳۰/۷، ۶/۲±۲۹/۹ و ۳/۸±۲۵/۴ نانوگرم در لیتر در محدوده‌ی ۱۳۴/۲-۱> نانوگرم در لیتر به دست آمد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه ما نشان داد که در تمامی نمونه‌های اخذشده از چهار شهر تبریز، کرمانشاه، زنجان و رشت، آلودگی به آفلاتوکسین M_1 وجود دارد که سطح این آلودگی در فصل‌های مختلف متفاوت بود. به‌نحوی‌که 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 ازلحاظ آفلاتوکسین B_1 و کنترل شیر و محصولات آن به جهت عدم حضور آفلاتوکسین M_1 بسیار مهم است.

واژه های کلیدی: آفلاتوکسین M_1، شیر سنتی و صنعتی ، ELISA

* گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
نویسنده مسئول: **ghavimih@zums.ac.ir** ، شماره تلفن: ۰۲۴۳۳۴۴۸۸۷۴

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.[۱و۲]

آفلاتوکسین‌ها ازجمله 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 تراتوژن بوده و همچنین به‌عنوان عامل هپاتیت کبدی و سرطان مجاری صفراوی خارج کبدی شناخته‌شده‌اند[۴]. آفلاتوکسین‌ها عمدتاً شامل چهار دسته G_2, G_1, B_2, B_1 هستند[۱،۴]. 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 قرارگرفته است[۶]. خاصیت سرطان‌زایی، جهش‌زایی و سمیت آفلاتوکسین M_1 مشابه آفلاتوکسین B_1 است[۷]. در طی آزمایش‌های فراوان که توسط WHO/FAO تائید شده است، آفلاتوکسین M_1 و B_1 دارای خاصیت هپاتوتوکسیک، موتاژنیک و کارسینوژنیک می‌باشند. علاوه بر ایجاد برخی سرطان ها، آفلاتوکسین‌ها سیستم ایمنی بدن انسان را سرکوب می کنند و سمیت سایر ترکیبات کبدی را تقویت می کنند. 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 می گردد[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 تعیین‌شده است[۱۰،۱۱]. آفلاتوکسین‌ها در طیف وسیعی از مواد غذایی نظیر غلات ازجمله 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 می شوند مستعد آلودگی با گونه های آسپرژیلوس هستند که قادرند متابولیت های سمی و ماندگار در غذا را تولید بکنند. شیر یکی از مواد غذایی است که منشاء حیوانی دارد و ممکن اسن آلودگی با آفلاتوکسین در شیر ناشی از منبع تغذیه حیوان باشد. آلودگی شیر و سایر فراورده های لبنی به آفلاتوکسین یک خطر بالقوه برای سلامت انسان خصوصا در گروه سنی کودک، سالمند و زنان باردار در نظر گرفته می شود. 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].

مایکوتوکسین‌ها از خطرناک‌ترین آلاینده‌های مواد غذایی هستند که برای تجزیه‌وتحلیل کمی آن‌ها به یک روش قابل‌اعتماد نیاز است [۱۵]. به همین دلیل تعیین مقدار آفلاتوکسین M_1 در شیر و محصولات آن به‌منظور 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 نمونه های شیر تهیه شده به روش سنتی و صنعتی در چهار استان غربی کشور طی تمام فصول یک سال به روش ELISA می باشد تا مقایسه ای بر اثرات روش فراهمی شیر همچنین روش های دامداری متفاوت و تاثیر فصل بر شدت آلودگی نمونه های 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 research mode Essay- Persia ساخت شرکت Heidolph آلمان، Magnetic stirrer ساخت شرکت Heidolph آلمان مدل unimaylelo، اولترا سانتریفوژ BECKMAN آمریکا، هموژنایزر مدل Ho4AP ساخت Edmund Buhler آلمان، دستگاه (AWARE NESS usA stat fax -2100) ELISA plate reader، دستگاه (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 به‌تدریج 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 الایزا برای آفلاتوکسین M_1، با محدوده‌ی اندازه‌گیری ۸/۱–۰/۱ میکروگرم در کیلوگرم، مورد آنالیز قرار گرفت. اساس این آزمایش بر پایه واکنش ایمینوافینیتی رقابتی بین آنتی‌بادی آفلاتوکسین M_1 و آنتی‌ژن موجود در نمونه شیر یا استاندارد می‌باشد.

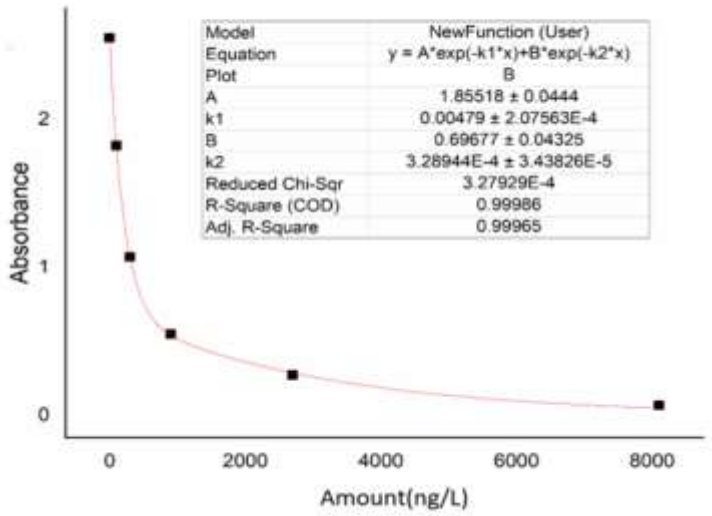
۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از محلول‌های استاندارد و نمونه‌های آماده‌سازی شده، به‌طور جداگانه در حفره‌های میکروپلیت اضافه، به‌آرامی مخلوط و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و محل تاریک انکوبه شدند. شست‌وشو با الایزا واشر در دو مرحله انجام شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول رقیق‌شده کونژوگه آنزیم به حفره‌ها اضافه شد، به‌آرامی 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 شست‌وشو 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 به‌آرامی 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 بارنگ 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 منجر به یک تغییر رنگ از آبی به زرد گردید. درنهایت میزان جذب نور در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر در مقابل شاهد هوا توسط دستگاه الایزا ریدر اندازه گرفته شد.

روش تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

داده‌های به‌دست‌آمده توسط دستگاه ELISA reader با استفاده از نرم‌افزار SPSS موردمطالعه آماری قرار گرفت. برای بررسی معنی‌دار 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 تهیه‌شده برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین M_1 در شیر را نشان می‌دهد.

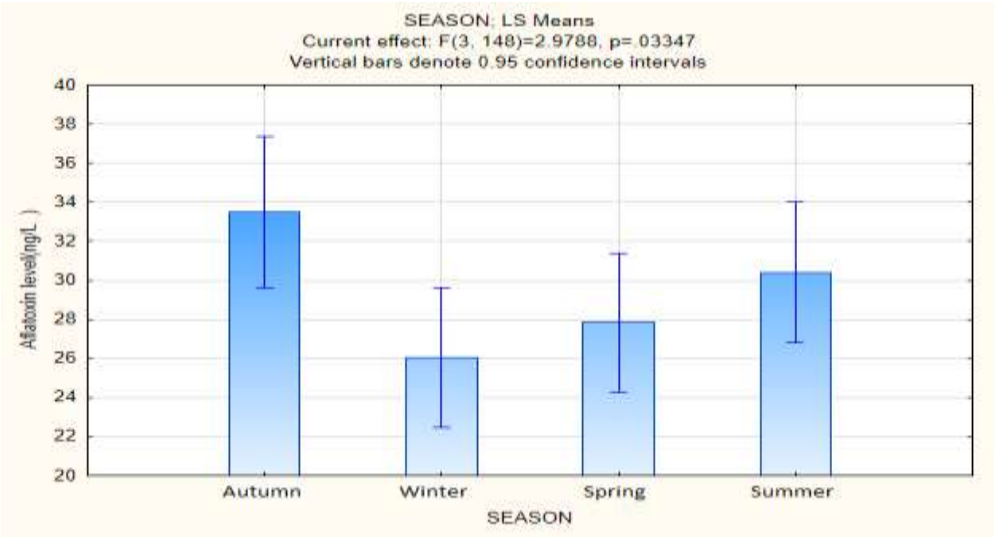


نمودار۱: منحنی کالیبراسیون آفلاتوکسین M_1، کیت الایزا

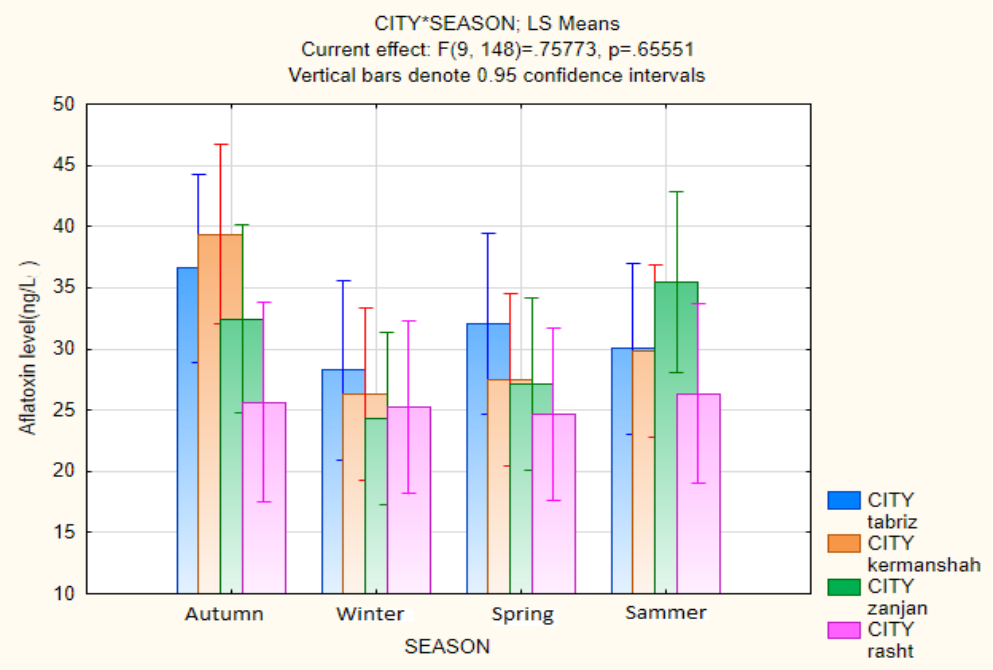
یافته‌ها

در این مطالعه، ۱۸۰ نمونه از ۴ شهر تبریز، کرمانشاه، زنجان و رشت جمع‌آوری شد که به روش الایزا، سطح آفلاتوکسین M_1 در آن‌ها بررسی گردید. میانگین غلظت آلودگی نمونه با آفلاتوکسین M_1 در شهر تبریز، کرمانشاه، زنجان و رشت به ترتیب با میانگین کلی ۳۱/۹±۶/۵، ۳۰/۷±۱۶/۹، ۲۹/۹±۶/۲ و ۲۵/۴±۳/۸ 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=۰/۶۵۵۵). اطلاعات کامل‌تر در جدول ۱ به تفضیل آورده شده است.

غلظت آفلاتوکسین M_1 در نمونه‌های شیر به ترتیب در بهار، تابستان، پاییز و زمستان به ترتیب ۲۷/۳±۶/۱۲، ۲۶/۷±۶/۲، ۳۲/۲±۱۸/۲ و ۲۶/۳±۵/۷ 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<۰/۰۵ یا P=۰/۰۳۳۴).



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



نمودار۳: میزان آفلاتوکسین M_1 در نمونه‌ها بر اساس فصل‌های مختلف سال

میزان آفلاتوکسین M_1 ازنظر نحوه‌ی تولید، در نمونه‌های سنتی و صنعتی به ترتیب دارای میانگین آلودگی ۲۹/۷±۱۳/۲ و ۲۶/۴±۶ نانوگرم در لیتر به دست آمد(تفاوت معنی‌دار بود P=۰/۰۳۴۶). اطلاعات کامل‌تر در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱: میانگین و محدوده‌ی آلودگی نمونه‌ها به آفلاتوکسین 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 M_1 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	۹۳	<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	۸۷	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 آفلاتوکسین M_1 در شهر تبریز و کمترین میزان در رشت دیده شد. همچنین ازنظر فصلی بیشترین و کمترین آلودگی به آفلاتوکسین M_1 در فصل پاییز و زمستان بود؛ که اختلاف معنی‌داری ازنظر تفاوت در میزان آفلاتوکسین M_1 وجود داشت. ازنظر نوع تولید نیز، شیرهای تولیدشده به روش سنتی، میزان آلودگی به آفلاتوکسین M_1 بیشتری داشتند که اختلاف ازنظر آماری معنی‌دار بود. بیشترین و کمترین میزان آفلاتوکسین 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 درنهایت آلودگی کمتر به آفلاتوکسین M_1 باشد.

آلودگی نمونه‌های شیر به آفلاتوکسین 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 آفلاتوکسین M_1 در فصول مختلف سال، دچار تغییر می‌گردند، به‌نحوی‌که در فصول سرد سال و عمدتاً فصل پاییز، شاهد بیشترین آلودگی با آفلاتوکسین M_1 بودیم. ٪۱۰۰ نمونه‌های شیر خام موردمطالعه آلوده به آفلاتوکسین M_1 و ٪۱/۶ از نمونه‌ها دارای غلظت آفلاتوکسین بالاتر از حد مجاز تعیین‌شده توسط سازمان استاندارد ایران و اروپا که ۵۰ نانوگرم در لیتر می‌باشد بودند. محدوده‌ی آلودگی به آفلاتوکسین M_1 میان کل نمونه‌های موردمطالعه، ۱۳۴/۲–۱< نانوگرم در لیتر به دست آمد.

مطالعات مختلفی در سرتاسر ایران انجام‌شده است و آلودگی به آفلاتوکسین M_1 در ٪۱۰۰ نمونه‌های شیر جمع‌آوری‌شده از اهواز، شیراز، تهران و اراک مشاهده شد [۱۶]. که نتایج همسو بامطالعه‌ی ما بود. اما در مطالعه‌ی موثق و همکاران که بر روی نمونه‌های شیر سنتی در شهر میاندوآب انجام شد،۵۰ درصد نمونه‌ها آلوده به آفلاتوکسین 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 انجام‌شده است. نشان داد میزان آفلاتوکسین 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 آفلاتوکسین 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 آفلاتوکسین 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 ازجمله آفلاتوکسین‌ها را فراهم می‌کند [۲۰].

کامکار و همکارانش نیز در شهر سراب ۱۱۱ نمونه شیر را موردبررسی قرار دادن که ٪۷۶/۶ از نمونه‌ها آلوده آفلاتوکسین 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 مطالعه ی ما بیشتر بود. به‌علاوه ازنظر 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 آفلاتوکسین M_1 انجام‌شده است. به‌عنوان‌مثال، در مطالعه‌ای در کشور چین انجام شد، میزان آلودگی آفلاتوکسین M_1 ، ٪۱۰۰ گزارش شد و ٪۲۹ نمونه‌ها، آلودگی بیشتر از حد مجاز (۵۰ نانوگرم در لیتر) داشتند [۲۲]. در مطالعه‌ای

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، ازجمله 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 گزارش‌شده 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 M_1 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 M_1 در شیر بیان‌شده‌اند، تجزیه آفلاتوکسین M_1 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 M_1 جلوگیری از آلودگی اولیه مواد غذایی مصرفی گاوهای شیری می‌باشد. همچنین آگاه‌سازی دامداران در مورد این مایکوتوکسین و کاهش زمینه‌های تولید آن، ارزیابی مستمر خوراک و علوفه دام ازنظر میزان آلودگی به آفلاتوکسین B_1، بررسی دوره‌ای شیرها ازنظر آلودگی به آفلاتوکسین M_1، 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 ازاین‌رو بررسی و اندازه‌گیری میزان M_1 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 موردبررسی از ۴ شهر مختلف، بیشترین میزان آلودگی به آفلاتوکسین M_1 در شهر تبریز و کمترین میزان در رشت با میانگین ۳۱/۹±۶/۵ و ۲۵/۴±۳/۸ نانوگرم در لیتر، دیده شد. همچنین ازنظر فصلی بیشترین و کمترین آلودگی به آفلاتوکسین M_1 در فصل پاییز و زمستان مشاهده شد.

تفاوت در میزان آلودگی شیر خام به آفلاتوکسین M_1 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 می نماید.

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, Omidi 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.

Journal of Environmental Health Engineering, October 2023; Vol.11, No. 1: 76- 88

Determination of aflatoxin M_1 in milk samples of Zanjan, Gilan, East Azerbaijan and Kermanshah provinces by ELISA method

Hamed Ghavimi[1], Yasaman Taghavi [1], Farinaz Esmi [2], Javad Tajkey[3], Saeed Rezaei[4], Mehran Mohseni [5]

[1]*Department of Toxicology, Department of Toxicology and Pharmacology, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical sciences, Zanjan, Iran*
[2]*Department 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 Phrmacy, 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 M_1.

Results: In this study, 180 samples were collected from 4 cities of Tabriz, Kermanshah, Zanjan and Rasht, where the level of aflatoxin M_1 was measured by ELISA method. The results showed that 100% of the examined samples were infected with aflatoxin M1 and the average concentration aflatoxin M_1 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 M_1 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 M_1 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 M_1.

Keywords: Aflatoxin M_1, Raw milk, Pasteurized milk, ELISA