

## ارزیابی آلودگی میزان آفلاتوکسین M<sub>1</sub> در نمونه‌های شیر خام به روش الیزا در استان یزد

رامک یحیی رعیت<sup>۱\*</sup>، حجت اله شکری<sup>۲</sup>، علیرضا خسروی<sup>۳</sup>، سپیده ترابی<sup>۴</sup>

(۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(۲) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین، آمل، ایران

(۳) مرکز تحقیقات قارچ شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(۴) بخش کنترل مواد غذایی، اداره کل دامپزشکی، یزد، ایران

(دریافت مقاله: ۲۹ دی ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۲۲ فروردین ماه ۱۳۹۶)

### چکیده

**زمینه مطالعه:** آفلاتوکسین M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) مشتق مونوهیدروکسیله اصلی آفلاتوکسین B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) تشکیل شده در کبد است و به درون شیر ترشح می‌شود. AFM<sub>1</sub> سبب خطرات بهداشتی خاصی برای سلامتی انسان می‌شود. هدف: هدف این مطالعه تعیین میزان AFM<sub>1</sub> در نمونه‌های شیر خام در استان یزد بود. روش کار: این بررسی یک مطالعه مقطعی-توصیفی بود. ۸۰ نمونه شیر خام از چهار شهر (یزد، تفت، مهریز و صدوق) در استان یزد در فصول زمستان و بهار جمع‌آوری شدند. غلظت AFM<sub>1</sub> با روش الیزا تعیین شد. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از آزمون‌های ANNOVA و Chi-square انجام شد. نتایج: تمام نمونه‌ها (۱۰۰٪) با AFM<sub>1</sub> در محدوده غلظت از ۳/۱۸ ng/l تا ۹۲/۳۴ با یک میانگین غلظت ۲۲/۰۷ ng/l آلوده شدند. میزان AFM<sub>1</sub> در ۱۳/۷٪ از نمونه‌های شیر خام بیشتر از حداکثر حد مجاز ۵۰ ng/l پذیرفته شده توسط اتحادیه اروپا (EU) بود. میزان آلودگی AFM<sub>1</sub> در نمونه‌های زمستان (۲۸/۲۱ ng/l) بیشتر از نمونه‌های بهار (۱۵/۹۲ ng/l) بود. همچنین، بیشترین و کمترین میزان آلودگی به ترتیب در نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده از شهرهای صدوق (میانگین ۴۲/۲۱ ng/l) و یزد (۱۲/۷۹ ng/l) مشاهده شدند. نتیجه گیری نهایی: ما نتیجه‌گیری می‌کنیم که AFM<sub>1</sub> با یک میانگین غلظت ۲۲/۰۷ ng/l در نمونه‌های شیر استان یزد شناسایی شد. بعلاوه، ۱۳/۷٪ از نمونه‌ها دارای AFM<sub>1</sub> در سطوح خطرناک برای سلامتی انسان بودند.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین M<sub>1</sub>، شیر خام، الیزا

### مقدمه

معمول نگهداری و حرارتی مانند پاستوریزاسیون، استریلیزاسیون و اتوکلاو از خود مقاومت نشان می‌دهد (۱۳، ۳۵). برای سنجش AFM<sub>1</sub> می‌توان از روش‌های متعدد نظیر کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی مایع (LC)، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و الیزا (ELISA) استفاده نمود (۲۲، ۵۲). مزیت استفاده از الیزا شامل کاهش زمان انجام آزمایش، روش آسان آماده‌سازی و استخراج نمونه، هزینه پایین و حساسیت بالای آن می‌باشد (۱۳، ۵۱). کمیته اروپایی و غذایی کودکس و موسسه ملی استاندارد ایران، ماکزیمم میزان AFM<sub>1</sub> را در شیر خام و سایر محصولات شیری حدود ۵۰ ng/l تعیین کرد که نایبستی از این میزان تجاوز نماید (۲۴). با توجه به اینکه شیر و محصولات شیری غذای اصلی انسان هستند، مصرف مدام شیرهای آلوده برای انسان مخاطره‌انگیز می‌باشد. به همین دلیل اکثر کشورها قوانینی جهت کنترل میزان AFB<sub>1</sub> در جیره غذایی دام‌ها و حد مجاز AFM<sub>1</sub> در شیر جهت کاهش این خطرات دارند (۲۸). هدف از انجام این تحقیق بررسی میزان AFM<sub>1</sub> در شیر خام جمع‌آوری شده از چهار شهر استان یزد در دو فصل زمستان و بهار بود.

### مواد و روش کار

نمونه‌های شیر: در مجموع ۸۰ نمونه شیر خام (حجم هر نمونه ml

آفلاتوکسین‌ها سمومی هستند که اغلب بر روی محصولات گیاهی مانند پسته، بادام زمینی، ذرت، برنج، پنبه دانه و گندم یافت می‌شوند (۶). این مایکوتوکسین به وسیله بعضی از سویه‌های آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس، آسپرژیلوس نومیوس و آسپرژیلوس پسودوتاماری تولید می‌شود و به عنوان سردسته تمام سموم قارچی بیشتر مورد توجه محققین و مراجع بهداشتی قرار می‌گیرند (۱۳، ۱۵). حداقل ۱۸ نوع آفلاتوکسین در طبیعت شناسایی شده‌اند که در بین آن‌ها آفلاتوکسین‌های B<sub>1</sub>، B<sub>2</sub>، G<sub>1</sub> و G<sub>2</sub> بسیار مهم می‌باشند. زمانیکه حیوانات جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) مصرف نمایند، این توکسین در کبد متابولیزه شده و ۱۲ تا ۲۴ ساعت بعد به صورت آفلاتوکسین M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) در شیر تشخیص داده می‌شود. نسبت بین AFB<sub>1</sub> خورده شده به AFM<sub>1</sub> دفع شده در شیر بین ۰/۵ تا ۵٪ در منابع مختلف تخمین زده شده است (۲۲، ۴۷). سمیت AFM<sub>1</sub> شامل ممانعت از کدبرداری RNA و سنتز پروتئین، جهش‌زایی، تراژون‌زایی، سرطان‌زایی، آسیب‌های کبدی، کلیوی، گوارشی، ریوی و مغزی و همچنین سرکوب سیستم ایمنی بدن می‌باشد (۳۰، ۵۱). بررسی‌ها نشان داده است که سمیت AFM<sub>1</sub> حدود یک دهم AFB<sub>1</sub> است. شایان ذکر است که AFM<sub>1</sub> نسبت به روش‌های



جدول ۱. آلودگی نمونه‌های شیر به AFM۱ در شهرهای مختلف استان یزد.

شهر	تعداد نمونه آلوده	آفاتوکسین M1 (میانگین $\pm$ انحراف معیار) (ng/l)		تعداد نمونه‌های آلوده بر اساس کمیته اروپایی و غذایی کودکان و موسسه ملی استاندارد ایران (۵۰ ng/l)
		زمستان	بهار	
یزد	۲۰	۱۸/۵ $\pm$ ۰/۶	۷/۰۲ $\pm$ ۰/۰۲	۱
تفت	۲۰	۱۹/۱۱ $\pm$ ۰/۷	۹/۱۰ $\pm$ ۰/۰۷	۱
صدوق	۲۰	۴۷/۳۲ $\pm$ ۷/۸	۳۷/۰۹ $\pm$ ۷/۵	۷
مهریز	۲۰	۲۷/۹۲ $\pm$ ۷/۳	۱۰/۴۲ $\pm$ ۰/۰۹	۲
جمع کل	۸۰	۲۸/۲۱ $\pm$ ۷/۱	۱۵/۹۲ $\pm$ ۰/۴۲	۱۱

انجام گردید. برای مقایسه میزان آلودگی بین دو فصل از آزمون کای (Chi-square) استفاده گردید.

### نتایج

در این مطالعه ۱۰۰٪ نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده از استان یزد حاوی AFM۱ بودند. حداقل و حداکثر غلظت AFM۱ در کل نمونه‌های آزمایش شده به ترتیب ۳/۱۸ ng/l و ۹۲/۲۴ (با میانگین ۲۲/۰۷ ng/l) بودند. در ۶۹ نمونه (۸۶/۳٪) غلظت‌های کمتر از ۵۰ ng/l بدست آمدند، در حالی که ۱۱ نمونه (۱۳/۷٪) حاوی بیش از ۵۰ ng/l توکسین در شیر خام بودند.

محدوده‌های غلظت AFM۱ در نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده در فصول بهار و زمستان به ترتیب از ۳/۱۸ ng/l تا ۷۱/۴۸ و از ۳/۲۷ ng/l تا ۹۲/۲۴ بودند. تعداد نمونه‌های آلوده همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است میزان آلودگی شیر به AFM۱ در فصل زمستان (میانگین ng/l ۲۸/۲۱) بیشتر از فصل بهار (میانگین ng/l ۱۵/۹۲) بوده است و تجزیه و تحلیل آماری اختلاف معناداری را بین دو فصل نشان داد ( $p < ۰/۰۵$ ). تعداد ۸ و ۳ نمونه شیر خام به ترتیب در فصول زمستان و بهار حاوی بیش از ۵۰ ng/l توکسین بودند.

نتایج بدست آمده به تفکیک شهرها نشان دادند که بیشترین میزان آلودگی شیر خام به AFM۱ مربوط به شهرستان صدوق (میانگین ng/l ۴۲/۲۱) و سپس مهریز (میانگین ng/l ۱۹/۱۷)، تفت (میانگین ng/l ۱۴/۱۱) و یزد (میانگین ng/l ۱۲/۷۹) بوده است که تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که اختلاف معناداری بین آلودگی شیر شهر صدوق با سایر شهرهای تحت مطالعه وجود دارد ( $p < ۰/۰۵$ ).

### بحث

پتانسیل خطرات ناشی از AFM۱ در سلامت انسان به خصوص در ایجاد سرطان کبد از طریق شیر و محصولات شیری بسیار با اهمیت است. در مطالعه حاضر، ۱۰۰٪ نمونه‌های شیر خام تحت مطالعه آلوده به AFM۱ بودند. طبق مطالعات صورت گرفته در مناطق مختلف ایران مشخص شد که میزان آلودگی به AFM۱ در ۱۰۰٪ نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده از

۳۰ به صورت تصادفی از گاوداری‌های مختلف شیری (یک نمونه از هر گاوداری شیری) در شهرهای مختلف استان یزد نظیر یزد، تفت، مهریز و صدوق جمع‌آوری شدند. نمونه‌برداری در دو فصل زمستان و بهار انجام گرفت. قبل از انجام آزمایش وسایل و مواد مورد نیاز جهت نمونه‌گیری با مواد شوینده شستشو شده تا آلودگی احتمالی از بین برود و سپس به وسیله دستگاه اتوکلاو سترون گردید. نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده در شرایط استریل و در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

**آماده‌سازی نمونه‌ها:** تمام نمونه‌های شیر سرد در سانتریفیوژ بیخچال‌دار با دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و لایه‌های چربی بالایی آن‌ها خارج شدند. سپس ۱۰۰  $\mu$ l از نمونه شیر بدون چربی جهت بررسی AFM۱ جدا گردید (۱۴).

**اندازه‌گیری AFM۱ به روش الایزا:** در این آزمایش کیت الایزای AFM۱ (R-Biopharm, Germany) جهت اندازه‌گیری AFM۱ در شیر استفاده گردید. آزمایش طبق دستورالعمل سازنده کیت انجام شد. به طور خلاصه، ۵۰  $\mu$ l از هر کدام از استانداردها (۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ ng/l و ۲۰۰۰) به ۵۰  $\mu$ l از نمونه شیر بدون چربی در درون چاهک اضافه شد. سپس به ترتیب میزان ۵۰  $\mu$ l کنژوکه و ۵۰  $\mu$ l آنتی‌بادی هم به هر چاهک اضافه گردید. کیت به صورت دستی چندین بار در جهات مختلف حرکت داده شد تا تمام محتویات هر چاهک کاملاً با هم مخلوط شود. کیت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. بعد از ۱۰ دقیقه تمام محتویات کیت خارج گردید و کیت سه مرتبه با آب مقطر شستشو شد. به کیت به صورت وارونه ضربه زده شد تا تمام آب مقطر موجود در چاهک‌ها تخلیه شده و چاهک‌ها کاملاً خشک شوند. سپس ۱۰۰  $\mu$ l از محلول کروموژن به هر چاهک اضافه شد و سپس کیت به صورت دستی چندین بار در جهات مختلف حرکت داده شد تا تمام محتویات چاهک با هم مخلوط شوند. سپس کیت به مدت ۵ دقیقه در محیط تاریک قرار داد شد. پس از ۵ دقیقه، ۱۰۰  $\mu$ l محلول متوقف کننده به هر چاهک اضافه شد. کیت چندین بار تکان داده شده و سپس با دستگاه الایزای ریدر (Bio-Tech, Germany) با طول موج ۴۵۰ nm میزان جذب نوری اندازه‌گیری گردید و پس از رسم منحنی، غلظت AFM۱ محاسبه گردید.

**تجزیه و تحلیل آماری:** آنالیز آماری نتایج با نرم افزار SPSS (version ۱۶) با تست توکی (One way ANNOVA) با سطح معنی‌داری ۰/۰۵



جدول ۲. آلودگی نمونه‌های شیر به AFM1 در مناطق مختلف ایران.

منابع	غلظت (ng/l) AFM1			روش اندازه‌گیری	فصل نمونه برداری	شهر	استان
	% نمونه‌های بیشتر از حد مجاز (50 ng/l)	میانگین ± انحراف معیار	حد اکثر				
Movassagh (۲۶)	۵۰	-	۲۵۰	۵	الایزا	تبریز	آذربایجان شرقی
Movassagh و همکاران (۲۷)	۳۷/۷۷	۱۴۸/۳۷±۱۹/۲۷	-	-	الایزا	تبریز	تایبستان
Kamkar (۱۲)	۴۰	-	۲۸۰	۱۵	الایزا	سراب	تمام فصول
Tajik و همکاران (۴۸)	۶/۲	۲۳/۲۲± ۸/۶۵	۹۱/۸۰	۴/۳۰	الایزا	ارومیه	تمام فصول
Movassagh و همکاران (۲۸)	-	-	۵	۰	الایزا	میان‌دو آب	بهار
Kamkar و همکاران (۱۴)	۱۴/۷۵	۴۰/۰۱	۱۱۲/۴	۴	الایزا	اردبیل	پاییز، زمستان
Rahimi و همکاران (۳۸)	۵۵/۹	۶۵± ۴۹	۲۱۸	۱۲	الایزا	اصفهان	پاییز
Sepehr و همکاران (۴۵)	۱۲/۵	۰/۰۲۵±۰/۰۰۳	۰/۲۶	۰	الایزا	اصفهان	-
Tajkarimi و همکاران (۴۹)	-	۰/۰۰۶۸۴± ۰/۰۱۴۶۵	۰/۰۲۲۱۰	۰/۰۰۲۵۳	HPLC	گلیپایگان	زمستان، تابستان
Vagef و همکاران (۵۳)	۲۷/۵	-	-	-	الایزا	ایلام	زمستان، تابستان
Karim و همکاران (۱۶)	۸۲/۲	-	۳	۰/۰۲	الایزا	تهران	تمام فصول
Oveisi و همکاران (۳۴)	۷۸	۷۲/۲± ۲۳/۵۰	۱۱۳	۳۱	الایزا	تهران	بهار، تابستان
Rahimi و همکاران (۳۸)	۳۳/۴	۶۲±۴۸	۲۱۸	۱۲	الایزا	شهرکرد	تمام فصول
Karimi و همکاران (۱۷)	۵/۴	۱۸/۳۳± ۱۷/۶۶	۸۹	۸	الایزا	مشهد	بهار
Maktabi و همکاران (۲۰)	۳۴/۸	۴۸/۲۸± ۴/۸۸	۲۲۵	۵	الایزا	اهواز	تمام فصول
Kamkar و همکاران (۱۵)	۱۸	۱۱۶	۴۱۹	۳/۶	الایزا	شوش	زمستان، بهار، تابستان
Tajkarimi و همکاران (۴۹)	-	۰/۰۰۵۹۷± ۰/۰۲۹۹۲	۰/۰۲۴۷۱	۰/۰۰۲۶۱	HPLC	زنجان	زمستان، تابستان
Moenian و همکاران (۲۵)	۳۸/۶	۴۷/۵±۳۶/۵	۱۶۷	۰	HPLC	سمنان	پاییز، زمستان
	۶/۶	۲۵/۸±۱۷/۱	۷۷	۰		دامغان	
	۳۷/۵	۶۲/۲±۱۰۶/۳	۷۴۳	۰		شاهرود	
	۵۱	۷۹/۴±۶۲/۵	۲۸۳	۰		گرمسار	
Alborzi و همکاران (۱)	۱۷/۸	-	۳۶۶	۱۷	HPLC	شیراز	بهار، تابستان
Ersali و همکاران (۷)	۳۱/۷۷	-	۷/۵	۰/۰۳	TLC	شیراز	تمام فصول
Khosravi و همکاران (۱۹)	۳۳/۴	۳۸/۸۲± ۴/۰۹	۱۴۸/۰۱	۰/۰۴	EIA	قزوین	تمام فصول
Norian و همکاران (۳۲)	۲۲/۵۲	۰/۲۱۵±۰/۰۵۳	۰/۷۱۵	۰/۰۱۴۹	الایزا	قزوین	زمستان
Mohammadian و همکاران (۲۴)	۴/۴	۱۲/۶۵± ۱۷/۷۶	۱۱۵/۹۳	۰/۰۰۷	الایزا	سنندج	تمام فصول
Tajkarimi و همکاران (۴۹)	-	۰/۰۱۴۷۹± ۰/۰۶۸۲۷	۰/۰۳۹۵۱	۰/۰۰۶۵۱	HPLC	کرمان	زمستان، تابستان
Sadeghi و همکاران (۴۱)	۹۲/۱۸	۷۲۱	۲۴۲۰	۴۴۰	الایزا	کرمانشاه	تمام فصول
Tajkarimi و همکاران (۴۹)	۴۲	۷۶± ۲/۴۰	۳۹۰	۰	HPLC	گلستان	تمام فصول
Tajkarimi و همکاران (۵۰)	۴۹	۴۴± ۳/۱۰	۳۹۰	۰	HPLC	گیلان	تمام فصول
Kazemi و همکاران (۱۸)	۳۷/۱۱	-	۱۳۱	۲/۱	الایزا	رشت	پاییز، زمستان
Nazari و همکاران (۳۱)	۱۲	۹	۵۵۳	۰	الایزا	خرم‌آباد	زمستان، تابستان
Sefidgar و همکاران (۴۳)	۵۶/۷	۱۰۲/۷۳± ۱۳/۲۱	۳۵۲/۳۰	۵۰	الایزا	بابل	زمستان
Sefidgar و همکاران (۴۴)	۱۰۰	۲۳۰/۲± ۲۹/۸۰	۲۵۳/۵۰	۱۷۸/۸۰	الایزا	بابل	زمستان
Barami و همکاران (۳)	۳۰	-	-	-	الایزا	چالوس	زمستان، تابستان
Barami و همکاران (۳)	۴۵	-	-	-	الایزا	رامسر	زمستان، تابستان
Ranjbar و همکاران (۳۹)	-	۱۲/۷۸±۶/۱۲	۴۴/۴۷	۲/۵۱	الایزا	اراک	تمام فصول
Ghiasian و همکاران (۸)	۱۷/۷	۴۳/۴± ۴/۳۱	۴۱۰	۱۰	HPLC	همدان	تابستان، زمستان

شهرهای ارومیه، کرمانشاه، اردبیل و تبریز (غرب کشور) (۱۴، ۲۷، ۴۱، ۴۸)، مشهد (شرق کشور) (۱۷)، رشت، بابل و رامسر (شمال کشور) (۳، ۴۳، ۴۹).



در مواد غذایی بسیار ایده‌آل هستند. در مجموع، با مقایسه بین مطالعات مختلف، میزان آلودگی نمونه‌های شیر یزد بیشتر از ارومیه، مشهد و سنجند و کمتر از سایر شهرهای تحت مطالعه در ایران بوده است. علل احتمالی تفاوت در میزان آلودگی شیر در شهرهای مختلف ایران می‌تواند مربوط به زمان نمونه‌برداری، روش اندازه‌گیری توکسین و میزان رعایت مقررات بهداشتی مرتبط با جیره غذایی و تجهیزات دامداری در شهرها باشد. در مورد روش‌های توکسین‌سنجی، اگرچه روش‌های مختلفی نظیر TLC، LC، HPLC و الایزا برای سنجش AFM1 در شیر و فرآورده‌های شیری وجود دارند، ولی الایزا روش مناسب‌تری از حیث سرعت، حساسیت، سهولت کار و هزینه است (۱۳، ۵۱). این موضوع در اکثر مطالعات انجام شده در ایران نشان داده شده است. در حالی که آنالیز HPLC نمونه‌های شیر خام مربوط به هفت منطقه از ایران (شامل گرگان، سمنان، دامغان، شاهرود، گرمسار، رشت و شیراز) نشان داد که میزان آلودگی AFM1 تا حدودی بیشتر از آلودگی بدست آمده در تست الایزا بودند (۲۵، ۵۰). بنابراین قبول یک روش استاندارد و قابل قبول برای اندازه‌گیری AFM1 در شیر یک گام مهم است. همچنین در مطالعه حاضر گاوها اغلب با سیلوی ذرت، کنسانتره، یونجه و علوفه خشک تغذیه شده بودند. در مزارع شیری ایران، حیوانات تقریباً با مواد غذایی فوق تغذیه می‌شوند، اما نوع دامداری، نوع و کیفیت علوفه مورد استفاده، مدت زمان و شرایط ذخیره‌سازی آن‌ها در میان مزارع مختلف یک شهر و همچنین میان شهرهای مختلف نظیر یزد، مهریز، تفت و صدوق متفاوت هستند.

مطالعات مختلفی در زمینه آلودگی شیر خام به AFM1 در سایر کشورها انجام شده است. در مطالعه انجام شده در چین (۱۰)، ۲۸۰ نمونه (۵۲/۸٪) از ۵۳۰ نمونه شیر خام، آلوده به AFM1 بودند و ۲۸/۹٪ آن‌ها غلظت‌های بیش از حد مجاز استاندارد (۵۰ ng/l) داشتند. بروز آلودگی به AFM1 در شیر خام جمع‌آوری شده در ترکیه ۳۰/۱٪ بود که ۱۷٪ نمونه‌ها دارای غلظت‌های بیشتر از ۵۰ ng/l بودند (۹). در یک مطالعه انجام شده در اردن (۳۳)، کل ۱۷۵ نمونه شیر خام آلوده به AFM1 بودند (۱۰۰٪) که از این تعداد ۶۶٪ نمونه‌ها غلظت‌های بیش از حد مجاز استاندارد (۵۰ ng/l) داشتند. در برزیل (۴۲)، ۷۲/۹٪ نمونه‌های شیر خام آلوده به AFM1 بودند که ۱۰/۱٪ آن‌ها غلظت بیش از ۵۰ ng/l داشتند. در سایر کشورها مثل پاکستان (۱۱)، هندوستان (۴۶)، مراکش (۲۱)، لبنان (۲)، آرژانتین (۲۳) و کروواسی (۴)، میزان آلودگی شیر خام به ترتیب ۷۱٪ (۴۱٪ نمونه‌ها غلظت بیش از حد مجاز استاندارد)، ۱۰۰٪ (۴۸/۹٪ بیش از حد مجاز استاندارد)، ۲۷٪ (۸٪ بیش از حد مجاز استاندارد)، ۷۳/۷٪ (۴۵٪ بیش از حد مجاز استاندارد)، ۳۸/۷٪ (۱۹/۴٪ بیش از حد مجاز استاندارد) و ۱۰۰٪ (۶۳/۲٪ بیش از حد مجاز استاندارد) گزارش شدند. تفاوت در میزان آلودگی شیر خام به AFM1 بین ایران و سایر کشورها می‌تواند مربوط به ناحیه جغرافیایی و شرایط آب و هوایی، فصل مطالعه، تعداد نمونه، روش‌های مختلف سنجش

اهواز (جنوب کشور) (۲۰) و اراک، شیراز و تهران (مرکز کشور) (۳۴، ۳۹)، مشاهده شد که این نتایج با مطالعه ما همخوانی داشتند. میزان آلودگی به AFM1 در نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده از شهرهای میاندوآب (۲۸)، سراب (۱۲)، اصفهان (۳۸) و سنجند (۲۴) به ترتیب ۳۰٪، ۵۰٪، ۹۰/۳٪، ۷۶/۶٪ و ۹۴/۴۹٪ بودند.

در بررسی ما، میانگین غلظت AFM1 در کل نمونه‌های شیر خام حدود ۲۲/۰۷ ng/l تعیین شد که ۱۳/۷٪ این نمونه‌ها بیشتر از ۵۰ ng/l (حد مجاز استاندارد) توکسین داشتند. نتایج متغیری در ایران در خصوص میزان غلظت AFM1 در شیر خام گزارش شده است (جدول ۲). طبق مطالعات صورت گرفته مشخص شد محدوده آلودگی نمونه‌های مختلف شیر خام از ۰ تا ۲۴۲۰ ng/l می‌باشد که کمترین آلودگی متعلق به شهر میاندوآب با محدوده آلودگی ۰ تا ۵ ng/l و بیشترین آلودگی متعلق به شهر کرمانشاه با محدوده آلودگی ۴۴۰ تا ۲۴۲۰ ng/l است (۲۸، ۴۱). استاندارد اروپا حد قابل قبول آفلاتوکسین شیر را ۵۰ ng/l تعیین کرده است (۲۴). بر این اساس مقادیر آفلاتوکسین در هیچ یک از نمونه‌های شیر خام جمع‌آوری شده از شهرهای شیراز (۷، ۱)، گرگان (۵۰)، رشت (۱۸، ۴۹)، همدان (۸)، میاندوآب (۲۸)، سراب (۱۲)، ارومیه (۴۸)، تبریز (۲۷)، اردبیل (۱۴)، ایلام (۵۳)، شهرکرد (۳۷)، مشهد (۱۷)، اهواز (۲۰)، سمنان (۲۵)، دامغان (۲۵)، شاهرود (۲۵)، قزوین (۱۹، ۳۲)، سنجند (۲۴)، خرم‌آباد (۳۱)، چالوس (۳)، رامسر (۳) و اصفهان (۴۵) بیشتر از حد مجاز استاندارد نبودند، در حالی که نمونه‌های شیر خام مربوط به شهرهای کرمانشاه (۹۲/۱۸٪) (۴۱)، اصفهان (۵۵/۹٪) (۳۸)، تهران (۷۸ و ۸۲/۲٪) (۳۴، ۱۶)، گرمسار (۵۱٪) (۲۵) و بابل (۱۰۰ و ۵۶/۷٪) (۴۳، ۴۴) دارای غلظت‌های بیش از حد مجاز استاندارد بودند (۸، ۳۶). Karimi و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۱۷) در مشهد گزارش کردند که گرچه AFM1 در ۱۰۰٪ نمونه‌های شیر وجود داشتند، ولی میزان غلظت آن‌ها در مشهد کمتر از اکثر نقاط ایران بود که علل آن را مصرف غذاهای با آلودگی کمتر، وجود گاوداری‌های صنعتی، آموزش کارگران دامداری‌ها و فصل نمونه‌گیری (بهار) بیان کردند. همچنین Mohammadian و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۲۴) نشان دادند که ۲۵۷ نمونه از کل ۲۷۲ نمونه بدست آمده از سنجند دارای توکسین در محدوده بین ۰/۰۷ تا ۱۱۵/۹۳۰ ng/l بودند. AFM1 در اکثر نمونه‌ها در مقادیر پایین شناسایی شد بخاطر اینکه تولید شیر در سنجند اغلب در گاوداری‌های شیری با تعداد کم انجام می‌شود و کمتر از مواد غذایی انبار شده استفاده می‌گردد. در مطالعه انجام شده توسط Sefidgar و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۴۳) در بابل، ۱۰۰٪ نمونه‌های شیر آلودگی با AFM1 را نشان دادند که میانگین این آلودگی در فصل زمستان (۲۴) نمونه از هر ماه حدود ۲۳۰/۱۹ ng/l بود. در نمونه‌های بابل که حاوی غلظت بالایی از AFM1 بودند مشاهده شد که مواد غذایی برای مدت طولانی در رطوبت بالا و تهویه نامناسب ذخیره شده بودند که این شرایط برای رشد اسپرژیلوس فلاووس و تولید آفلاتوکسین‌ها



با رعایت دقیق مقررات بهداشتی مرتبط با تهیه و ذخیره‌سازی و همچنین آزمایشات منظم و مداوم بر روی نمونه‌های شیر خام انجام گیرد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان محترم از زحمات پرسنل اداره کل دامپزشکی استان یزد نهایت تشکر را می‌نمایند.

### References

- Alborzi, S., Pourabbas, B., Rashidi, M., Asstaneh, B. (2006) Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Shiraz (south of Iran). *Food Cont.* 17: 582-584.
- Assem, E., Mohamad, A., Oula, E.A. (2011) A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in raw and processed milk samples marketed in Lebanon. *Food Cont.* 22: 1856-1858.
- Barami, A.R., Pour Elmi, M.R., Irani, M. (2015) Contamination levels of aflatoxin M1 in bulk raw milk of Chaloos and Ramsar. *J Food Hyg.* 1: 53-60.
- Bilandžić, N., Varenina, I., Kolanović, B.S., Luburić, D.B., Benić, M., Cvetnić, L., Tanković, S., Cvetnić, Z. (2016) Monitoring of aflatoxin M1 in raw cow milk in Croatia during winter 2015. *Mljekarstvo.* 66: 81-85.
- Choudhary, P.L., Sharma, R.S., Borkhartria, V.N. (1998) Effect of chilling and heating on aflatoxin M1 content of contaminated Indian cow's milk. *Egypt J Dairy Sci.* 26:223-229.
- Deshpande, S.S. (2002) Fungal toxins. In: *Hand-Book of Food Toxicology.* Deshpande, SS. (ed.). New York: Marcel Decker. p. 387-456.
- Ersali, A.A., Beigi, F.B., Ghasemi, R. (2009) Transition of aflatoxin M1 from feed stuffs to animal milk and pasteurized milk in shiraz city and urban. *Sadooghi Yazd.* 17: 175-183 (In Persian).
- Ghiasian, S.A., Maghsood, A.H., Tirang, R., Neyestani Mirhendi, S.H. (2007) Occurrence of Aflatoxin M1 in raw milk during the summer and winter seasons in Hamedan, Iran. *Food Safety* 27: 188-198.
- Golge, O. (2014) A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Adana province of Turkey. *Food Cont.* 45: 150-155.

توکسین، سیستم‌های مختلف پرورش دام‌ها و سیستم‌های گوناگون فرآوری شیر باشد.

در مطالعه حاضر میانگین آلودگی شیر به AFM1 در نمونه‌های بهار و زمستان به ترتیب ۱۵/۹۲ و ۲۸/۲۱ ng/l بودند. در فصل زمستان به دلیل استفاده از علوفه خشک و همچنین استفاده از علوفه انباری در تغذیه دام‌ها و عدم رعایت شرایط نگهداری نامناسب در انبارها میزان آلودگی بالاتر است. مطالعات قبلی نشان از تنوع فصلی آلودگی شیر به AFM1 و بروز بالاتر این آلودگی در طی فصل زمستان داشتند (۸،۱۳،۴۳،۵۰) که با مطالعه ما همخوانی دارند. یکی از دلایل زمینه ساز آلودگی در فصل زمستان در استان یزد این است که در این فصل دام‌ها به دلیل سرمای زمستان در مناطق بسته نگهداری می‌شوند و به جای چرای آزاد توسط غذاهای انبار شده که عموماً به دلیل رطوبت بالای زمستان کپک زده هستند تغذیه می‌گردند. دوم اینکه در این ماه دسترسی به علوفه تازه امکان پذیر نیست و دامداران محلی از نان خشک جهت تغذیه دام‌های خود استفاده می‌کنند، در حالی که در فصل بهار بیشتر از علوفه تازه استفاده می‌کنند. انجام بررسی‌های گسترده تر در زمینه تنوع فصلی می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در مورد عوامل مؤثر بر تولید AFB1 در مواد غذایی فراهم نماید که خود در بدن به AFM1 متابولیزه می‌گردد. کشورهای دارای حد مجاز قانونی برای این توکسین نشان دادند که با روش‌های مناسب داشت، کاشت، برداشت و ذخیره سازی محصولات کشاورزی می‌توانند میزان این توکسین را کاهش دهند. بهترین راه برای حذف مستقیم آلودگی شیر با AFM1 همانا جلوگیری از آلودگی اولیه مواد غذایی مصرفی گاوهای شیری می‌باشد. با این حال، 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 AFM1 در شیر بیان شده اند، اما اکثر محققین نشان دادند که فرآیند حرارتی نظیر پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون موجب کاهش بسیار ناچیز توکسین در شیر می‌گردد (۳). تجزیه با AFM1 با کمک روش‌های ترکیبی مثل اشعه ماورای بنفش، امواج مایکروویو، اشعه گاما و ترکیبات جاذب هم انجام شده است (۵۴). برخی تست‌های آزمایشگاهی نشان دادند که ترکیبات جاذب مختلفی همچون آلومین‌ها، سیلیکات‌ها و آلومینوسیلیکات‌ها قادرند به آفلاتوکسین‌ها متصل شده و موجب دفع آن‌ها از بدن گردند (۳۶). متأسفانه در رابطه با تأثیر این ترکیبات جاذب بر روی اجزای شیر اطلاعات زیادی در دسترس نمی‌باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان آلودگی AFM1 در ۱۳/۷٪ از نمونه‌های شیر خام مصرفی در استان یزد بالاتر از حد مجاز ۵۰ ng/l است که توسط اتحادیه اروپا تعیین شده است. به منظور کاهش تولید این توکسین ضروری است تا برنامه‌های آموزشی و ترویجی برای تولیدکنندگان راجع به خطر بالقوه آفلاتوکسین‌ها، کاهش غلظت AFB1 در علوفه دام‌ها



10. Guo, L.Y., Zheng, N., Zhang, Y.D., Du, R.H., Zheng, B.Q., Wang, J.Q. (2016) A survey of seasonal variations of aflatoxin M1 in raw milk in Tangshan region of China during 2012-2014. *Food Cont.* 69: 30-35.
11. Iqbal, S.Z., Asi, M.R. (2013) Assessment of aflatoxin M1 in milk and milk products from Punjab, Pakistan. *Food Cont.* 30: 235-239.
12. Kamkar, A. (2005) A study on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Cont.* 16: 593-599.
13. Kamkar, A., Fallah, A.A., Mozaffari Nejad, A.S. (2014) The review of aflatoxin M1 contamination in milk and dairy products produced in Iran. *Toxin Rev.* 33: 151-154.
14. Kamkar, G.H., JahedKhaniki, R., Alavi, A. (2011) Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produce in Ardebil of Iran. *Iran J Environ Health Sci Eng.* 2: 123-128.
15. Kamkar, A., Yazdankhah, S., Mohammadi Nafchi, A., Mozaffari Nejad, A. (2014) Aflatoxin M1 in raw cow and buffalo milk in Shush city of Iran. *Food Addit Contam.* 7: 21-24.
16. Karim, G., Bokaei, S., Khorasani, A. (1998) Contamination of raw milk with aflatoxin M1 in Tehran using ELISA. *Pajooresh J.* 40: 163-165 [In Farsi].
17. Karimi, G., Hassanzadeh, M., Teimuri, M., Nazari, F., Nili, A. (2007) Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Mashhad, Iran. *IJPS.* 3: 153-156.
18. Kazemi Darsanaki, R., Azizollahi Aliabadi, M., Mohammad Doost Chakoosari, M. (2013) Aflatoxin M1 contamination in ice cream. *J Chem Health Risks.* 3: 43-46.
19. Khosravi, A.R., Shokri, H., Eshghi, S., Darvishi, S. (2013) Global occurrence of aflatoxin M1 in milk with particular reference to Iran. *Food Sec.* 5: 533-539.
20. Maktabi, S., Hajj Hajjkolaie, M.R., NajafAbadi, M. (2011) Determination of aflatoxin M1 in raw milk in Ahvaz using ELISA. *Global Vet.* 7: 44-49.
21. Marnissi, B.E., Belkhou, R., Morgavi, P.D., Ben-nani, L., Boudra, H. (2012) Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk collected from traditional dairies in Morocco. *Food Chem Toxicol.* 50: 2819-2821.
22. Mashak, Z., Jafari Sohi, H., Heshmati, A., Mozaffari Nejad, A.S. (2016) Assessment of aflatoxin M1 contamination in UHT - flavored milk samples in Karaj, Iran. *Iran J Pharm Res.* 15: 407-411.
23. Michlig, N., Signorini, M., Gaggiotti, M., Chiericatti, C., Basílico, J.C., Repetti, M.R., Beldomenico, H.R. (2016) Risk factors associated with the presence of aflatoxin M1 in raw bulk milk from Argentina. *Food Cont.* 64: 151-156.
24. Mohammadian, B., Khezri, M., Ghasempour, N., Mafakheri, S.H., Poorghafour Langroudi, P. (2010) Aflatoxin M1 contamination of raw and pasteurized milk produced in Sanandaj, Iran. *Arch Razi Inst.* 2: 99-104. (In Persian).
25. Moeenian, K., Yaghmaeian, K., Ghorbani, R. (2014) Aflatoxin M1 concentration in raw milk produced in the cities of Semnan province - Iran. *Koomesh.* 15: 176-181.
26. Movassagh, M.H. (2001) Aflatoxin M1 contamination in the marketed cow's raw milk of Tabriz, Iran. *Ann Biol Res.* 2: 292-296.
27. Movassagh, M.H., Adinehvand, S. (2013) Study of aflatoxin M1 level in the collected raw cow milk from milk collection centers in Tabriz. *J Food Hyg.* 3: 63-70.
28. Movassagh, M.H., Khodabandelo, E., Movassagh, A. (2011) Detection of Aflatoxin M1 in cow's raw milk in miandoab city, West Azarbaijan province, Iran. *Global Vet.* 6: 313-315.
29. Mozaffari Nejad, A.S., Bayat, M., Ahmadi, A.A. (2013) Investigation of aflatoxin B1 in spices marketed in Hyderabad, India using ELISA method. *J Pure Appl Microbiol.* 7: 3219-3223.
30. Mozaffari Nejad, A.S., Sabouri Ghannad, M., Kamkar, A. (2014) Determination of aflatoxin B1 levels in Iranian and Indian spices by ELISA method. *Toxin Rev.* 33: 160-168.
31. Nazari, A., Novrouzi, H., Movahedi, M., Kaksarian, M. (2007) Determination of aflatoxin M1 levels in raw and pasteurized milk in Koram Abad city by Using HPLC. *Yafteh.* 9: 49-56. (In



- Persian).
32. Norian, R., Pourfarzaneh, A.R., Mashatian, F. (2015) Determination of aflatoxin M1 in raw milk produced in Qazvin Province By ELISA and HPLC. *J Food Microbiol.* 1: 7-13.
  33. Omar, S.S. (2016). Aflatoxin M1 levels in raw milk, pasteurised milk and infant formula. *Italian J Food Safety.* 5: 5788.
  34. Oveisi, M.R., Jannat, B., Sadeghi, N., Hajimahmoodi, M., Nikzad, A. (2007) Presence of aflatoxin M1 in milk and infant milk products in Tehran, Iran. *Food Cont.* 18: 1216-1218.
  35. Park, D.L. (2002) Effect of processing on aflatoxin. *Adv Exp Med Biol.* 504: 173-179.
  36. Phillips, T.D., Sarr, A.B., Grant, P.G. (1995) Selective chemisorption and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay. *Natur Toxins.* 3: 204-247.
  37. Rahimi, E., Karim, G. (2008) Detection of Aflatoxin M1 Levels in produced raw milk of Chaharmahal Baktiari farm by ELIZA. *Food Sci Indust.* 5: 51-58.
  38. Rahimi, E., Shakerian, A., Jafariyan, M., Ebrahimi, M., Riahi, M. (2009) Occurrence of aflatoxin M1 in raw, pasteurized and UHT milk commercialized in Esfahan and Shahr-e Kord, Iran. *Food Sci.* 1: 317-320.
  39. Ranjbar, S., Noori, M., Nazari, R. (2010) Study of milk aflatoxin M1 and its relationship with feed fungi flora in Markazi Province. *JCT.* 1: 9-18.
  40. Razavilar, V. (2001) Pathogenic microorganisms in foods and epidemiology of food poisoning. Tehran University Press, Tehran, Iran, p. 189-240 [In Persian].
  41. Sadeghi, E., Almasi, A., Bohloli-Oskoi, S., Mohamadi, M. (2013) The evaluation of aflatoxin M1 level in collected raw milk for pasteurized dairy factories of Kermanshah. *Zahedan J ResMed Sci.* 15: 26-29.
  42. Santili, B.N., Camargo, A.C., Nunes, R.S.R., Gloria, E.M.G., Machado, P.F., Cassoli, L.D., Dias, C.T.S., Calori-Domingues, M.A. (2016) Aflatoxin M1 in raw milk from different regions of São Paulo state-Brazil. *Food Addit Contam.* 8: 207-214.
  43. Sefidgar, A.A., Gholampour Azizi, E., Khosravi, A.R., Mohamadi, R. (2008) Survey of aflatoxin M1 levels in raw milk of Babol city. *Pak Biol Sci.* 11: 484-486.
  44. Sefidgar, A.A., Gholampour Azizi, E., Mirzaei, M., Hadizadeh, S.H., Azarmi, M. (2007) Comparison of aflatoxin M1 levels in pasteurized milk of Babol city in winter and summer. *J Babol Univ Med Sci.* 9: 27-31.
  45. Sepehr, S.H., Amin, J., Masoomeh, G.H., Sahab, S.H. (2012) Detection and occurrence of Aflatoxin M1 level in milk and white cheese produce in Esfahan state Iran. *Res J Biol Sci.* 7: 225-229.
  46. Siddappa, V., Nanjegowda, D.K., Viswanath, P. (2012) Occurrence of aflatoxin M1 in some samples of UHT, raw & pasteurized milk from Indian states of Karnataka and Tamilnadu. *Food Chem Toxicol.* 50: 4158-4162.
  47. Soha, S., Borji, M. (2008) Reductions of aflatoxin M1 in milk utilizing some chemisorption compounds and study their effects on milk composition. *Pajouhesh & Sazandegi.* 74: 19-26. (In Persian).
  48. Tajik, H., Razavi Rohani, S.M., Moradi, M. (2007) Detection of Aflatoxin M1 in raw and commercial pasteurized milk in Urmia, Iran. *Pak J Biol Sci.* 10: 4103-4107.
  49. Tajkarimi, M., Aliabadi, S.F., Salahnejad, A., Poursoltani, H., Motallebi, A.A., Mahdavi, H. (2008) Aflatoxin M1 contamination in winter and summer milk in 14 states in Iran. *Food Cont.* 19: 1033-1036.
  50. Tajkarimi, M., Shojae Aliabadi, F., Salah Nejad, M., Pursoltani, H., Motallebi, A.A., Mahdavi, H. (2007) Seasonal study of aflatoxin M1 contamination in milk in five regions in Iran. *Food Microbiol.* 116: 346-349.
  51. Tavakoli, H.R., Kamkar, A., Riazipour, M., Mozaffari Nejad, A.S., Rafati, H. (2013) Assessment of aflatoxin M1 levels by ELISA in yoghurt consumed in Tehran, Iran. *Asian J Chem.* 25: 2836-2838.
  52. Tavakoli, H.R., Riazipour, M., Kamkar, A., Rafati, H., Mozaffari Nejad, A.S. (2012) Occur-



- rence of aflatoxin M1 in cheese samples from Tehran, Iran. *Food Cont.* 23: 293-295.
53. Vagef, R., Mahmoudi, R. (2013) Occurrence of aflatoxin M1 in raw and pasteurized milk produced in west region of Iran (during summer and winter). *Int Food Res J.* 20: 1421-1425.
54. Yousef, A.E., Marth, E.H. (1985) Degradation of aflatoxin M1 in milk by ultraviolet energy. *J Food Prot.* 48: 697-698.





## Evaluation of the contamination of aflatoxin M1 level in raw milk samples by ELISA method in Yazd province

Yahyaraeyat, R.<sup>1\*</sup>, Shokri, H.<sup>2</sup>, Khosravi, A.R.<sup>3</sup>, Torabi, S.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

<sup>3</sup>Mycology Research Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>4</sup>Food Control Section, Veterinary Office, Yazd, Iran

(Received 18 January 2017, Accepted 11 April 2017)

### Abstract:

**BACKGROUND:** Aflatoxin M1 (AFM1) is the main monohydroxylated derivative of aflatoxin B1 (AFB1) formed in liver and excreted into milk. AFM1 creates certain hygienic risks for human health. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to determine AFM1 level in raw milk samples in Yazd province. **METHODS:** This investigation was a descriptive-cross sectional study. Eighty raw milk samples were collected from four cities (Yazd, Taft, Mehriz and Sadogh) in Yazd province in winter and spring seasons. The concentration of AFM1 was determined by ELISA method. The analysis of the results was performed using ANOVA and Chi-square tests. **RESULTS:** All samples (100%) were contaminated with AFM1, with the concentrations ranging from 3.18 to 92.24 ng/l with a mean concentration of 22.07 ng/l. AFM1 level in 13.7% of raw milk samples was higher than the maximum tolerance limit of 50 ng/l accepted by the European Union (EU). The contamination level of AFM1 in winter samples (28.21 ng/l) was higher than spring samples (15.92 ng/l). Also, the highest and lowest contamination levels were observed in milk samples collected from Sadogh (mean 42.21 ng/l) and Yazd (12.79 ng/l) cities, respectively. **CONCLUSIONS:** Results demonstrated AFM1 was detected with a mean concentration of 22.07 ng/l in milk samples of Yazd province. Moreover, 13.7% of samples contained AFM1 at hazardous levels for human health.

**Keyword:** aflatoxin M1, raw milk, ELISA

### Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Contamination of milk samples to AFM1 in different cities of Yazd province.

**Table 2.** Contamination of milk samples to AFM1 in different regions of Iran.



\*Corresponding author's email: ryahya@ut.ac.ir, Tel: 011-44271057, Fax: 011-44271054

J. Vet. Res. 72, 3, 2017