Archive of SID

در
امور دام و آبزیان شماره ۷۹ تابستان ۱۳۸۷
پژوهش و سازندگی

تعیین میزان آفلاتوکسین M_1 با استفاده از روش الایزا در شیر خشک های صنعتی تولید شده در ایران

• ابوالفضل کامکار
گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی ، دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه تهران
تاریخ دریافت: فروردین ماه ۱۳۸۶ تاریخ پذیرش: آبان‌ماه ۱۳۸۶
Email:akamkar@ut.ac.ir

چکیده

این مطالعه به منظور تعیین وضعیت حضور آفلاتوکسین M_1 در شیر خشک‌های صنعتی عرضه شده در شهر تهران که توسط کارخانجات مختلف داخلی تولید و روانه بازار مصرف شده بودند توسط روش الایزای رقابتی صورت گرفت. بدین منظور تعداد ۴۲ نمونه شیر خشک ارزیابی شدند. نتایج حاصله نشان داد که ۱۰۰٪ نمونه های شیر خشک به آفلاتوکسین M1 آلوده بوده و محدوده آلودگی بین سه فصل با یکدیگر تفاوت داشت به‌گونه‌ای که این محدوده در سه فصل بهار، پاییز و زمستان به ترتیب ۵۱ تا ۹۱۴، ۳۲ تا ۶۴۰ و ۳۲ تا ۸۷۹ نانوگرم درکیلو گرم بود. میانگین آلودگی در سه فصل سال به ترتیب ۳۰۵ ، ۲۷۸ و ۲۸۵ نانوگرم در کیلو گرم به دست آمد، به ترتیب بالاترین و پایین‌ترین میانگین آلودگی در نمونه های شیر خشک تولید شده در پاییز و بهار به ترتیب ۹۱۴ و ۳۲ بود. محاسبات آماری نشان داد که تفاوت معنی داری بین غلظت آفلاتوکسین M_1 شیر خشک‌های تولید شده در پاییز با بهار و زمستان وجود ندارد ($P>0/05$) به عبارت دیگر میزان آفلاتوکسین M_1 شیر خشک های تولید شده درپاییز پایین تر از دو فصل دیگرسال نبود. تقریبا ۸۰/۷ درصد نمونه ها آلودگی بالاتر از حد استاندارد ۵۰ نانوگرم در کیلو گرم (استاندارد اتحادیه اروپا) و ۲۶/۹ درصد نیز بالای حد استاندارد ۵۰۰ نانوگرم در کیلو گرم (استاندارد ایران) و کدکس الیما نتاریوس (Codex Alimentarius) را نشان می‌دادند. با توجه به اهمیت آفلاتوکسین برای سلامتی انسان و آلودگی شیر خشک ها ی صنعتی این امر به طور قابل ملاحظه‌ای می‌تواند برای سلامتی انسان خطرناک باشد.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین M_1 ، شیر خشک، الایزا

www.SID.ir

Archive of SID

Pajouhesh & Sazandegi No 79 pp: 174-180

Detection of aflatoxin M_1 in powdered milk samples by ELISA

By: Kamkar, A. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine. University of Tehran.

This study was undertaken to determine the presence and levels of aflatoxin M_1 (AFM_1) in powdered milk produced by different plants in Iran. For this purpose, 42 powdered milk samples analyzed, and competitive ELISA was used to determine the presence and levels of AFM_1. AFM_1 was found in 100% of 42 of the powdered milk samples examined. The range of contamination levels varied among different seasons. AFM1 in Spring, Autumn and Winter samples ranged from 51 to 914, 32 to 640 and 32 to 879 ng/kg respectively, while the mean values were 305, 278 and 285 ng /kg respectively. The highest mean concentration of aflatoxin M_1 (AFM_1) was registered in Spring samples (914 ng /kg).Also the lowest mean concentration of aflatoxin M_1 was registered in Autumn and Winter samples (32 ng /kg).Statistical evaluation showed that there were not significant differences ($p>0.05$) between the concentrations of AFM_1 of powdered milk samples produced in Spring, Autumn and Winter. In other words, AFM_1 contents of powdered milk samples produced in Spring were not lower than powdered milk samples produced in Autumn and Winter. Almost 80.7% of the contaminated samples exceeded the maximum acceptable levels (50 ng /kg, EU standard) while 26.9 % of the samples exceeded the 500 ng /kg (Codex alimantarius, Iran). It was therefore concluded that, high occurrence of AFM_1 in powdered milk samples were considered possible hazards for human health.

Keywords: Aflatoxin M_1; Powdered Milk; ELISA

مقدمه

کشـور پهناور ایران با جمعیتی حدود ۷۰ میلیـون نفر دارای فرهنگ و سـنت ریشه‌ای و شـرایط جغرافیایی متنوع می‌باشد.آشنا نبودن اکثریت کشـاورزان و صاحبان دام به شـرایط رشـد و نمـو میکروارگانیسـم‌ها، به خصوص قارچ‌ها، سـالانه به طور مشـهود خسـارات مالی قابل توجهی و به شکل غیر معمولی صدمات جسمی و جانی قابل تأملی را به جمعیت انسان و دام در کشورما وارد می‌کند.

قارچ‌ها قادرند که در طی مدت رشـد خود برروی مواد غذایی، علاوه بر کاهش ارزش غذایی متابولیت‌های ثانویه‌ای به نام سـم قارچی تولید نمایند که بسیار خطرناک بوده و می‌تواند در صورت دریافت این سم توسط موجود زنده اثرات سـمی، سـرطان‌زایی، ناقص الخلقه‌زایی کاهش رشـد و اثرات جهش زایی از خود برجا بگذارند (۱۱).

آفلاتوکسین‌ها گروه بزرگی ازسموم قارچی هستند که توسط گونه‌های خاص از جنس آسپرژیلوس شامل *Aspergillus flavous*، *A. parasiticus* و *A. nomius* تولید می‌شـوند این گروه از سموم قارچی به عنوان سردسته تمامی سـموم قارچی محسوب می‌شوند به همین دلیل بیش از سایر سموم قارچی مورد توجه محقیقن و مراجع بهداشـتی قرار گرفته‌اند تاکنون بیش از ۱۸ نوع آفلاتوکسـین شناخته شده است که از میان آنها انواع M_1,B_1,G_1 بیشترین اهمیت را دارند، که در بین آنها آفلاتوکسین B_1 از همه خطرناکتر می‌باشد (۶).

آفلاتوکسـین هـای M_1,B_1 دارای اثـرات سـمی تراتوژنیـک و کارسینوژنیک بوده به گونه‌ای که آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان آنها را به عنوان ترکیبات سـرطان زا در انسـان و حیوانات معرفی نموده است با این تفاوت که اثرات سـرطان‌زایی آفلاتوکسـین M_1 ضعیف‌تر می‌باشد (۱۲، ۱۷، ۱۸).

آفلاتوکسـین M_1 اولین باقیمانده آفلاتوکسـین است کـه در بافت گاوهای شـیری مشـاهده می‌شـود، شـیر احتمالاً تنها ماده غذایی مورد مصرف انسـان اسـت که به صـورت طبیعی بـا آفلاتوکسـین M_1 آلوده می‌شود.

آفلاتوکسـین M_1 مشـتق هیدروکسـیله آفلاتوکسـین B_1 است. از زمان کشـف آفلاتوکسـین‌ها در دهه ۱۹۶۰ تاکنون، مقررات خاصی در بسـیاری از کشـورها برای محافظت مصرف کنندگان از اثرات زیان آور مایکوتوکسـین‌های موجود در مواد غذایی وضع شـده اسـت. این اصل کلـی در برخی از کشـورها با وضع مقررات خاصی تکمیل شـده اسـت کـه در برگیرنـده حد مجاز سـموم قارچی خـاص در اغذیه می‌باشـد. تفاوت‌هـای موجـود در مقررات مربـوط به ارزیابـی ایمنـی و کیفیت بهداشـتی اغذیه در کشـورهای مختلف، از نیازهای ملی و دانش موجود منشـاء می‌گیرد. براسـاس اطلاعات ارائه شده توسط سـازمان خواروبار جهانی (F.A.O) تا سـال ۱۹۹۷ مجموعاً ۷۷ کشـور تابع قوانین مربوط به سـموم قارچی بوده‌اند و این در حالی اسـت که ۱۳ کشـور فاقد این مقررات و حدود ۵۰ کشـور فاقد هر نوع اطلاعاتی در این رابطه بودند. و نام کشـورما ایران هم جزء ۱۳ کشوری است که فاقد مقررات مستقل به کنترل مایکوتوکسین‌ها درغذا هستند (۲۰، ۳۰).

با توجه به مطالب گفته شـده مطالعه وجود آفلاتوکسـین‌ها در شیر و فرآورده‌های آن از اهمیت قابل توجهی برخوردار است در این مطالعه هدف کلی ما شامل:

۱ـ تعیین وضعیت آلودگی شیر خشک های صنعتی تولید شده (توسط کارخانجات داخلی) عرضه شده در تهران به آفلاتوکسین M_1

۲ـ مقایسـه میزان آلودگی شیر خشـک های صنعتی با استانداردهای موجود در داخل و خارج کشور

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش کار

الف – مواد

مواد موجود در کیت آزمایش

هر کیت (ساخت شرکت R- Biopharm آلمان) شامل مواد کافی جهت انجام تعداد ۹۶ اندازه‌گیری بوده و حاوی مواد زیر بود:

یک عدد میکرو تیتر با تعداد ۹۶ گوده (در ۱۲ ردیف ۸ تایی) که با پادتن علیه AFM_1 پوشانیده شده بودند. شش عدد ویال حاوی محلول AFM۱ (هر یک به مقدار ۱/۳ میلی‌متر) باغلظت‌های برابر با: ppt (استاندارد صفر), ۰٫۵ ppt, ۱۰ ppt, ۲۰ ppt, ۴۰ ppt و ۸۰ ppt از AFM_1 در بافرشیر.

یک ویال محلول کونژوگه به میزان ۱/۳ میلی‌لیتر و حاوی محلول پراکسید کونژوگه شده با AFM_1.

یک ویال محلول سوبسترا (۷ میلی‌لیتر) حاوی پراکسید اوره .

یک ویال کروموژن (۷ میلی‌لیتر) حاوی تترا میتل بنزیدین.

یک ویال محلول متوقف کننده (۱۴ میلی‌لیتر) حاوی اسید سولفوریک نرمال.

یک ویال محلول بافر شماره ۱ به میزان ۲۰ میلی‌لیتر جهت رقیق‌سازی محلول نمونه و استاندارد.

یک ویال محلول بافر شماره ۲ به میزان ۱۲ میلی‌لیتر برای رقیق‌سازی محلول کونژوگه.

در ضمن کیت مربوط به AFM_1 حاوی یک عدد محلول بافر شستشو (نمک) نیز بود که جهت آماده‌سازی یک بافر فسفات (pH= ۷/۴) به کار رفته و شامل توئین ۲۰ با غلظت ۰/۰۵٪ بود.همچنین این کیت دارای جعبه حاوی محلول نمک بافربودکه یک بسته آن در یک لیتر آب مقطر حل می‌شد.

مواد مورد نیاز در آزمایشگاه

محلول متانول ۷۰٪ که از طریق مخلوط کردن ۷۰ میلی‌لیتر متانول خالص با ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر یا یونزدایی شده به دست می‌آید.

وسایل مورد نیاز:

اسپکتروفوتومتر مربوط به پلیت میکروتیتر مدل BDSLImmunosknplus ساخت شرکت LaB System.

دستگاه سانتریفوژ مدل IEC PR-J ساخت شرکت DAM۰N/ IECDIVISION.

دستگاه آسیاب.

دستگاه شیکر.

همزن مغناطیسی.

پیپت پاستور.

پیپت‌های مدرج ۱ و ۵ و ۱۰ میلی‌لیتری.

میکرو پیپت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۴۰۰ میلی‌لیتری.

ویال یونیورسال ۲۵ میلی‌لیتری.

ب – روش کار

جمع‌آوری نمونه‌ها

به منظور انجام این تحقیق نمونه‌های شیر خشک صنعتی مورد استفاده در صنایع غذایی تولید شده در ایران که آماده عرضه به بازار بودند، بطور تصادفی از چهار شرکت تولیدکننده عمده (جمعاً به تعداد ۴۲ نمونه) در سه فصل پاییز، زمستان و بهار (به منظور مشاهده اثر احتمالی فصل که تعدادی از مطالعات قبلی به آن اشاره نموده است) جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند.

روش آنالیز آماری

داده‌های جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS و با روش‌های آمار توصیفی (محاسبه نسبت آلودگی، میانگین و انحراف معیار) و آنالیز واریانس یکطرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

اصول آزمایش

اساس این آزمایش بر پایه واکنش پادگن – پادتن می‌باشد. حفره‌های میکروتیتر با پادتن‌های اختصاصی AFM_1 پوشانیده شده‌اند. ابتدا محلول‌های استاندارد آفلاتوکسین با محلول‌های نمونه اضافه شده و بعد از یک مرحله شستشو آنزیم کونژوگه افزوده می‌شود. AFM_1 آزاد و کونژوگه جهت باند شدن با جایگاه‌های اتصال پادتن‌های آفلاتوکسین با یکدیگر رقابت می‌کنند. سپس طی یک مرحله شستشو آنزیم‌های کونژوگه باند نشده حذف می‌گردند. سوبسترای آنزیمی (پراکسید اوره) و کروموژن (تترا متل بنزیدین) به حفره‌ها افزوده شده و گرمخانه گذاری می‌شوند. کونژوگه آنزیمی باند شده محلول کروموژن بدون رنگ را به محصولی با رنگ آبی تبدیل میکند. افزودن محلول متوقف کننده منجر به یک تغییر رنگ از آبی به زرد می‌گردد. اندازه گیری به روش فوتومتری و در طول موج ۴۵۰ نانومتر صورت می‌گیرد. میزان جذب نسبت معکوسی با غلظت آفلاتوکسین در نمونه دارد.

آماده سازی نمونه‌ها

بر اساس دستور العمل شرکت سازنده کیت نمونه‌های شیر در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد (۵۰ درجه فارنهایت) به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۳۵۰۰ g سانتریفوژ گرد ید ند.

پس از سانتریفوژ لایه بالایی نمونه‌ها با استفاده از پیپت پاستور به طور کامل برداشته شد.از شیر پس چرخ[1] که کاملاً بدون چربی بودند به طور مستقیم جهت آزمایش استفاده گردید (۱۰۰ میکرو لیتر به ازای هر گروه).

تکمیل آزمایش:

محلول کونژوگه آنزیمی

محلول کونژوگه آنزیمی AFM_1 به صورت محلول غلیظ تهیه می‌شد از آنجا که کونژوگه آنزیمی رقیق شده از پایداری محدودی برخوردار بود. تنها باید براساس میزانی که دقیقا مورد نیاز بود عمل بازآمیزی انجام می‌گرفت. به منظور عمل بازآمیزی این محلول به نسبت ۱:۱۱ (۱+۱۱) در محلول بافر شماره ۲ رقیق می‌شد.

روش آزمایش

تعداد کافی ازگوده های میکروتیتر در نگهدارنده گوده ها برای اندازه گیری استانداردها و نمونه‌ها قرارداده می شد.

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد یا نمونه به طور مجزا به

www.SID.ir

Archive of SID

حفره‌های دوتایی مورد نظر اضافه شـده عمل مخلوط کردن به طور دستی با ملایمت و از طریق تکان دادن پلیت انجام گرفته و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد) در محلی تاریک نگهداری می‌شد.

مایعات از داخل حفره‌ها خارج شـده و سـه مرتبه بطـور محکم ظرف نگهدارنده بصورت وارونه بر روی کاغذ جذب کننده برای اطمینان از خروج کامل آنها زده می‌شـد. سـپس تمام گوده هـا با ۲۵۰ میکرولیتـر از بافر شستشو پر وخالی شده این شستشو دوبار تکرار گردید.

مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول رقیق شـده کونژوگه آنزیم به گوده‌ها اضافه شـده، و به آرامی با دسـت تکان داده شـده و به مـدت ۶۰ دقیقه در محلی تاریک و در دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سـانتی‌گراد) نگاه داشـته شد.مرحله شستشو مانند دفعه قبل انجام شد.

مقدار ۵۰ میکرو لیتر از سوبسـترا و ۵۰ میکرو لیتر از محلول کروموژن به هر یک از گوده‌ها اضافه شـده طبق همان روش دسـتی گفته شده عمل مخلوط کردن انجام شـده و به مدت ۳۰ دقیقه در محلی تاریک و در دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سـانتی‌گراد) نگاه داشته شد.مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول متوقف کننده به هر یک از گوده‌ها اضافه شـده و طبق روش گفته شده مخلوط گردیده و میزان جذب نور در طول موج ۴۵۰ نانومتر در مقابل شـاهد هوا اندازه گرفته شـد سـپس، با کمک نرم افزار تهیه شـده توسط شرکت سازنده کیت نهایتاً میزان آفلاتوکسین محاسبه گردید.

قرائت و تفسیر نتایج

میانگین مقادیر جـذب مربوط به محلول‌های اسـتاندارد و نمونه‌ها بر مقدار جذب مربوط به اولین محلول استاندارد (استاندارد صفر) تقسیم شده و در عدد ۱۰۰ ضرب گردید بنابراین اسـتاندارد صفر معادل ۱۰۰٪ شـده و مقادیر میزان جذب به صورت درصد بیان گردید.

میزان جذب٪ = ۱۰۰× میزان جذب محلول استاندارد (یا نمونه) / میزان جذب محلول استاندارد صفر

درصد میزان جذب محلول نمونه یا استاندارد

مقادیر محاسـبه شده برای اسـتانداردها در یک سیستم متناسب بر روی کاغـذ گراف نیمـه لگاریتمیک و در مقابل مقادیـر غلظت AFM۱ به صورت نانو گرم درکیلو گرم واردشد.

منحنی کالیبراسیون که بایستی برای AFM_1 در دامنه ۴۰-۱۰ نانو گرم درکیلو گرم (ppt) کاملاً خطی باشـد در ایـن مطالعه نیز خطی بود. غلظت AFM_1 بـه صورت نانو گرم درکیلو گـرم با توجه به مقادیر جذب مربوط به هر یک از نمونه‌ها از روی منحنی کالیبراسیون بدست آمد

به منظور بدسـت آوردن مقدار واقعی غلظت آفلاتوکسـین نمونه‌ها, با استفاده از نرم افزار همراه کیت الیزا مربوط به شرکت رید اسکرین[۲] براساس مقدار جذب نور و غلظت نمونه‌های استاندارد (۱) منحنی کالیبراسیون رسم گردید. سـپس براسـاس مقدار جذب نور در نمونه‌ها و با استفاده از منحنی کالیبراسیون مقدار واقعی آفلاتوکسین در نمونه‌ها اندازهگیری شد..

حساسیت۳ آزمایش

متوسط حد پایین تشخیص در آزمایش رید اسکرین AFM_1 برابر ۵ نانو گرم در لیتر می‌باشد.

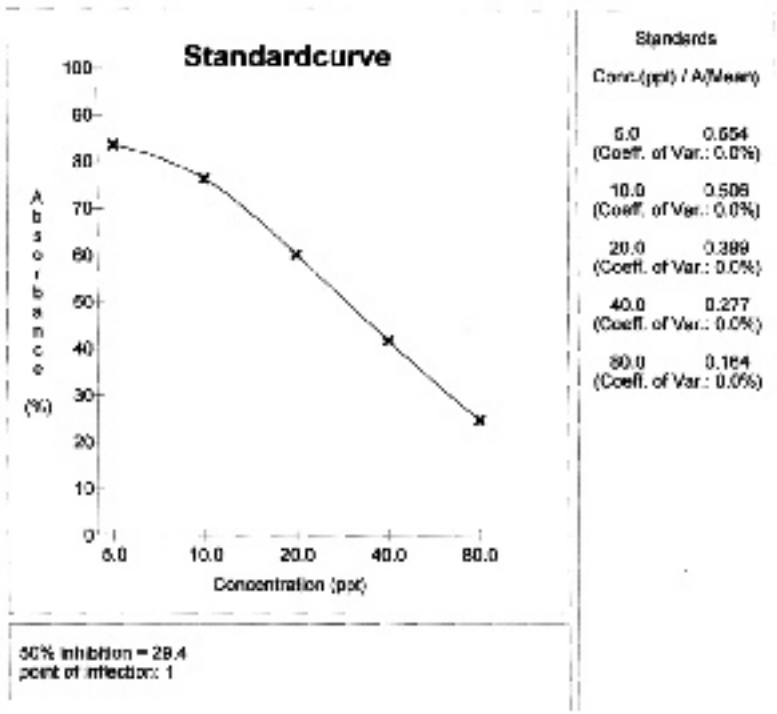
ویژگی۴ آزمایش

ویژگـی این آزمایش براسـاس آنالیـز واکنش‌های تداخلی نسـبت به مایکوتوکسین‌های مربوطه ثبت می‌گردد. در کیت مربوط به AFM_1 میزان واکنـش تداخلی بـا AFM_1 ۱۰۰٪ بوده و هیچ واکنش تداخلی نسـبت به آفلاتوکسـین هـای B_1, B_2 ,G_1،G_2 گزارش نشـد.واکنش تداخلی نسـبت به آفلاتوکسین M_1 هم اصلا مورد بررسی قرار نگرفته است.

قابلیت تکرارپذیری۵ آزمایش

صحت هر سری از آزمایشها از طریق نتایج سه آزمایش مختلف تعیین گردید.

نمودا رشـماره (۱) الگـوی دقیق ارزیابی آزمایشـهای ریدااسـکرین AFM_1 را نشـان می‌دهـد. ضرایـب تغییرات (CV٪)برای مقادیر جذب نور محلول‌های استاندارد به دست آمده در مقابل غلظت‌های مربوط به AFM۱ وارد می‌شـوند.



نمودار شماره (۱): منحنی استاندارد AFM_1

www.SID.ir

Archive of SID

ضرایب تغییرات با در نظر گرفتن کل دامنه آنقدر پایین هستند که یک قابلیت تکرارپذیری بالا را برای نتایج مورد نظر تعیین می‌کنند.

نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه در جداول شماره یک تا سه آمده است . به منظور انجام این تحقیق نمونه های شیر خشک صنعتی تولید شده در ایران که آماده عرضه به بازار بودند به طور تصادفی از چهار شرکت تولیدکننده عمده(جمعاً به تعداد ۴۲ نمونه) در سه فصل پاییز، زمستان و بهار به منظور مطالعه تاثیر فصل تولید شیر که تعدادی از مطالعات بیانگر این اثر می‌باشد ۱۷جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند (۷، ۱۶) .

تمامی نمونه‌ها ی مورد مطالعه از لحاظ آلودگی به آفلاتوکسین M۱ مثبت بودند و از میان ۴۲ نمونه تعداد ۲۱ نمونه آلودگی بالاتر از حد استاندارد را نشان میدادند که در واقع ۸۰/۷ درصد از کل نمونه‌ها را شامل می‌شد. این حد استاندارد ۵۰ نانوگرم در لیتر و مورد تایید کمیته تخصصی مشترک FAO/WHO می‌باشد. ضمناً در مقایسه با حد استاندارد ۵۰۰ نانوگرم در لیتر ، غلظت آلودگی آفلاتوکسینی ۲۶/۹ درصد نمونه‌ها بالای این حد قرارگرفتند. محدوده آلودگی به طور کلی بین ۹۱۴-۳۲ نانوگرم در لیتر در این مطالعه بدست آمد.

براساس آنالیز واریانس یکطرفه میانگین آلودگی بین ۳ فصل مورد مطالعه اختلاف معنی داری نداشت ($p>0/05$).

میانگین آلودگی آفلاتوکسینی محصول کارخانه A با B معنی دار نبود ولی میانگین آلودگی محصول کارخانه A ازکارخانه های C و D بیشتر بود در ضمن میانگین آلودگی کارخانه B ازکارخانه های C و D بیشتر بود ($p>0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه AFM_1 یکی از متابولیت‌های خطرناک AFB_1 می‌باشد و می‌تواند در شیر گاوهایی که از علوفه یا غذای کنسانتره آلوده به AFB_1 استفاده نموده‌اند وجود داشته باشد. لازم است جهت حفظ سلامت جامعه, شیرهای آلوده به سم را از شیرهای سالم تشخیص و تفکیک نمود و حد مجاز قابل قبولی برای وجود آن در شیر و فرآورده‌های آن تعیین نمود و همچنین با رعایت اصول پیشگیری از رشد قارچهای مولد AFB_1 جلوگیری نمود.

گزارشاتی که وجود دارد نشان دهنده این واقعیت است که محققین بیشتر کشورهایی که دارای صنعت دامداری پیشرفته هستند جهت تعیین وضعیت آلودگی شیر و فرآورده‌های آن به AFM_1 تحقیقاتی را انجام داده‌اند.

در ایران نیز در سال ۱۳۶۱ مطالعه‌ای توسط کریم و همکارانش صورت گرفت که با استفاده از روش TLC تعداد ۶۱ نمونه شیر شامل ۵۲ نمونه شیر دامداری‌های اطراف تهران که به صورت اتفاقی برداشت شده بود و ۷ نمونه مربوط به شیرهای پاستوریزه شده آزمایش شد و نتایج نشان داد که ۹۲/۳ درصد از شیرهای خام و ۱۰۰ درصد شیرهای پاستوریزه آلوده به AFM_1 بودند. این محققین میزان آلودگی به AFM_1 را در شیرهای خام بین ۱۰-۶ میکروگرم در لیتر و در شیرهای پاستوریزه ۵-۱ میکروگرم در لیتر گزارش نمودند (۲) .

همچنین خراسانی و کریم در سال ۱۳۷۵ با بررسی ۷۳ نمونه از شیرهای تحویلی به کارخانه شیر پاستوریزه تهران با استفاده ازروش الیزا نشان دادند که ۸۲/۲ درصد نمونه‌ها آلوده به AFM_1 بودند که در تمامی موارد غلظت این توکسین بالاتر از حد مجاز استاندارد کشورهای اروپایی (EC) یعنی ۵۰-۱۰ نانو گرم در لیتر بود. میانگین آلودگی بدست آمده ۲۵۹/۵ نانو گرم در لیتر با حدود تغییرات ۴۶۳-۵۶ نانو گرم در لیتر بوده است (۱) .

در بررسی کامکار ۶ /۷۶ درصد نمونه های شیر خام مورد مطالعه حاوی آفلاتوکسین M_1 بوده که در ۴۰ درصد آنها غلظت سم بالای حد مجاز بود (۱۰).

در مطالعه‌ای که بر روی میزان وقوع AFM_1 در شیر و فرآورده‌های آن که در منطقه وان ترکیه توسط Bakirci در سال ۲۰۰۱ انجام شد. از تعداد ۹۰ نمونه شیر ۸۷/۷۷ درصد آن با استفاده از روش TLC آلوده به AFM_1 تشخیص داده شد. که ۴۴/۳ درصد از نمونه‌های مثبت بالاتر از حداکثر قابل قبول (۵۰ ppt) بودند و بررسی‌های آماری تفاوت معنی‌داری ($p > 0/05$) بین میانگین غلظت‌های AFM_1 در نمونه‌های شیر اخذ شده از ماه مارس تا آوریل و از مارس تا می را نشان داد. نتایج مشخص نمود که تفاوت معنی‌داری بین محتوای AFM_1 شیر موجود در مخزن و شیر پاستوریزه شیر پس چرخ، ماست، روغن کره و آب پنیر وجود نداشت. محتوای AFM_1 پنیر سفیدشور و پنیر کاشر بالاتر از شیر مخزن بود در حالی که مقادیر آن در نمونه‌های خامه و کره یا پنیر پایین‌تر بود (۵).

Rostogi و همکارانش در سال ۲۰۰۳ با استفاده از روش الایزا نشان دادند که بروز آلودگی به AFM۱ در شیر و فرآورده‌های شیری مخصوص نوزادان در هندوستان ۸۷/۳ درصد بود که دامنه آن در فرآورده‌های شیری مخصوص نوزادان بالاتر (۱۰/۲-۶۵ نانو گرم در لیتر) از شیر مایع (۱۶۴-۲۸ نانو گرم در لیتر) بود. بررسی آلودگی به AFB_1 در خوراک گاوهای شیری مشخص کرد که این آلودگی در دامنه‌ای از ۹۳/۳-۱/۴ میکرو گرم در کیلوگرم با میانگین ۱۸ میکروگرم در کیلوگرم بوده که بالاتر از مقررات EC (۵ میکرو گرم در کیلوگرم) بود (۱۹).

Lopez و همکاران در سال ۲۰۰۳ با استفاده از روش الایزا، ۷۷ نمونه شیر را در آرژانتین در ماههای سپتامبر تا مارس (شیر زمستانی) مورد بررسی قرار دادند که در تمام موارد مقادیر آفلاتوکسین M۱ پایینتر از حد توصیه شده برای فرآورده‌های لبنی بود (۱۳) .

Martins و همکاران در سال ۲۰۰۴, ۹۶ نمونه ماست تجارتی (۴۸ عدد ماست ساده و ۴۸ ماست حاوی تکه‌های توت فرنگی) تولید شده در پرتغال را از نظر آلودگی به AFM_1 با استفاده از روش HPLC بررسی نمودند. در ۱۸/۸ درصد از نمونه‌های ماست, AFM_1 در محدوده‌ای از ۹۸-۱۹ نانوگرم در کیلوگرم تشخیص داده شد که دو مورد مربوط به ماست ساده و ۱۶ مورد در ماست‌های حاوی قطعات توت فرنگی بوده است (۱۴) . در مطالعه دیگری که به منظور تشخیص AFM_1 در نمونه‌های پنیر با استفاده از روش الیزا در منطقه آنکارای ترکیه توسط Sarimehmetoglu و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام گرفت(۲۱) ۴۰۰ نمونه پنیر مورد بررسی قرار گرفت که مقادیر مختلف AFM_1 در ۸۱/۷۵ درصد موارد تشخیص داده شد که ۲۷/۵ درصد موارد بالاتر از حد قانونی ۲۵۰ نانوگرم در کیلوگرم مقرر شده توسط کدکس غذایی ترکیه بوده است (۲۱) . Oliveria در سال ۱۹۹۷

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۱- میانگین و انحراف معیار غلظت آفلاتوکسین M1 (نانوگرم/کیلوگرم) درشیر خشک‌های صنعتی در فصول مختلف

فصل	تعداد	میانگین	انحراف معیار	حداقل	حداکثر
بهار	۱۰	۳۰۵	۳۰/ ۵	۵۱	۹۱۴
زمستان	۲۵	۳۲۸	۲۸/ ۵	۳۲	۶۴۰
پاییز	۷	۳۳۵	۲۷/ ۸	۳۲	۸۷۹
کل	۴۲	۳۲۴	۲۸/۲	-	-

جدول شماره ۲- میانگین و انحراف معیار غلظت آفلاتوکسین M1 (نانوگرم/کیلوگرم) در شیر خشک‌های صنعتی کار خانجات مختلف

کارخانه	تعداد	میانگین	انحراف معیار	حداقل	حداکثر
A	۱۱	۵۹۵	۲۴/ ۸	۲۱۵	۹۱۴
B	۱۰	۵۳۶	۹/۶	۳۹۹	۶۶۲
C	۸	۱۶۷	۶/۴	۳۲	۱۹۴
D	۱۳	۵۷	۲/۱	۳۲	۸۹
کل	۴۲	۳۲۴	۳/ ۲	-	-

جدول شماره ۳- فراوانی مطلق و نسبی توزیع نمونه های کارخانه‌های مختلف برحسب فصل سال

فصل / کارخانه	A	B	C	D
بهار	۴ (۳۶/ ۴)٪	۰	۳(۳۷/۵)٪	۳(۲۳/۱)٪
پاییز	۰	۴(٪۴۰)	۰	۳(۲۳/۱)٪
زمستان	۷(۶۳/۶)٪	۶(٪۶۰)	۵(۶۳/۵)٪	۷(۵۳/۸)٪
جمع	۱۱(۱۰۰) ٪	۱۰(۱۰۰) ٪	۸(۱۰۰) ٪	۱۳(۱۰۰) ٪

در برزیل تعداد ۳۰۰ نمونه شـیر خشـک را با روش الایزا مورد بررسی قرار داد نتایج حاصله نشـان داد که ۳۳ نمونه یا ۱۱ درصدف آنها دارای آلودگی آفلاتوکسـینی بوده انـد (۱۵). Aycicec و همکارانش نیز در ترکیه نشـان دادند که از تعداد ۲۲۳ نمونه انواع فرآورده های شیری ،۵۸/۹۰درصد آلوده به آفلاتوکسین بوده ولی تنها در ۵/۸ درصد آنها غلظت سم بالای ۰/۰۵ پی پی بود(۴). Garrido همکارانش در سال ۲۰۰۰ با کمک تکنیک الیزا تعداد ۱۳۹ نمونه از انواع شیر را از نظر آفلاتوکسین مطالعه نمودند و تنها ۹/۲۰ درصـد نمونه ها دارای آلودگی بالای حد مجـاز بودند (۹). در طول ۱۹۹۷ تعداد ۹۷ نمونه شـیر خشـک مورد اسـتفاده در تهیه غذای کودک توسط Golvano و همکارانـش مـورد ارزیابی قرار گرفت . تعداد ۸۱ نمونه یا ۸۴ درصد نمونه ها دارای

آفلاتوکسین M_1 بوده و تنها یک نمونه از نمونه های شیر خشک مورد مطالعه دارای آفلاتوکسین بالای حد مجاز پذیرفته شده بود (۸) .

بنابراین با توجه به مطالبی که ذکر شد، و همچنین نتایجی که در این تحقیق بدست آمد و با عنایت به اهمیت بالای آفلاتوکسین M_1 در بهداشت مواد غذایی و سـلامت انسـان و دام که دارای اثرات سـمی، سـرطان‌زایی

www.SID.ir

Archive of SID

و ناقص الخلقه زایی می باشد به گونه‌ای که آژانس بین المللی تحقیقات سرطان آنرا در ردیف ترکیبات سرطان‌زا قرار داده است و به علت مشکلات فراوانی که در ارتباط با سم زدایی شیر و فرآورده‌های آن از AFM_1 وجود دارد. به نظر می آید که درحال حاضر بهترین راه مقابله در درجه اول رعایت مسایل بهداشتی و تهیه یک جیره سالم و عاری از هرگونه آلودگی قارچی برای دام‌های شیری در دامداری‌هاست که هم سلامت عمومی دام و افزایش تولید آن حفظ می‌شود و هم سلامت جامعه تامین می‌گردد، ولی چون این روند همیشه قابل انجام نیست باید از روش‌هایی نیز برای از بین بردن قارچها و متابولیت‌های آنها در اجزای غذایی حیوان استفاده کرد. که به مهمترین آنها در زیر اشاره می گردد:

۱ - با توجه به اینکه دمای رشد مطلوب قارچ آسپرژیلوس و تولید حداکثر سم توسط کپک مذکور به ترتیب حدود ۲۵ و ۱۸ درجه سانتی‌گراد می‌باشد توصیه می‌شود که در دامداری‌ها (در صورت امکان)خوراک دام در دمای پایین‌تر از این محدوده نگهداری شود.

۲ - رعایت استاندارد مربوط به حد مجاز آلودگی شیر به AFM۱ و خوراک دام به AFB۱ در کشور .

پاورقی‌ها

1- Skimmed milk

2- RIDASCREEN

3- Sensitivity

4-Specifity

5-Reproducibility

منابع مورداستفاده

۱ - خراسانی، اکبر.۱۳۵۷؛ بررسی میزان آلودگی آفلاتوکسین M۱ در شیرهای تحویلی به کارخانه شیر پاستوریزه تهران با استفاده از روش الایزا، پایان‌نامه دکتری دامپزشکی دانشکده دامپزشکی ـ دانشگاه تهران، ۳۹-۱.

۲ - کریم، گ.، پروانه، و. وکردی، ج.، ۱۳۶۱؛ بررسی آلودگی شیر به آفلاتوکسین در منطقه تهران، مجلهٔ بهداشت ایران، سال یازدهم، شمارهٔ ۲-۱، صفحه ۸۴-۷۵.

3- Alcroft,R ., & Roberts ,B.A. 1968; The relationship between AFB1 intake by cows and excretion of AFM1 in milk .Veterinary Record, 82, 116-118.

4-Aycicec, H., & Abdorahman, A. 2004; Control of AFM_1 contamination in dairy products in Turkey, Food Control, 16 (3), 263- 266.

5 -Bakirci, I. 2001; A study on the occurrence of aflatoxin M1 in milk and milk products produced in Van province of Turkey. Food Control, 12, 47-51.

6- Creppy, E. E. 2002; Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicology Letters, 127, 19-28.

7- Galvano, F., Galofaro, V., & Galvano, G. 1996; Occurrence and stability of aflatoxin M_1 in milk and milk products. A worldwide review. Journal of Food Protection. 59 (10), 1079-1090.

8- Galvano, F., Glofaro, V., Ritieni, A., Bognanno, M., De Angelis, A., & Galvano, G. 2001; Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Italy: Second year of observation. Food Additives and Contaminants, 18(7), 644-646.

9- Garrido , N .S. 2003; Occurrence of AFM1 and milk commercialized in Riberio Brazil. Food Additives and Contaminants, 120 (1), 70-73.

10 - Kamkar, A.2005; A study on the occurrence of AFM1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. Food Control, 16(7), 593- 599

11-Kocabas, C. N., & Sekerel, B. E. 2003; Does systemic exposure to aflatoxin B1 cause allergic sensitization? Allergy, 58, 363

12- Lafont, P., Siriwardana, M., & Lafont, J. 1989; Genotoxicity of hydroxyl- aflatoxins M1 and M4. Microbiology Alimentarius Nutrition, 7, 1-8.

13-Lopez, C. E., Ramos, L. L., Romadan, S. S., & Bulacio, L. C. 2003; Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina. Food Control, 14(1), 31-34.

14 - Martins, M .L., & Martins, H .M. 2000; Aflatoxin M1 in raw and ultra high temperature – treated milk commercialized in Portugal. Food Additives and Contaminants, 17(10), 871-874.

15- Oliveria, C.A., Germano, P.M., Bird, C., & Pinto, C.H. 1997; Immunochemical assessment of aflatoxin M1 in milk powder consumed by infants in Sao Paulo, Brazil. Food Additives and Contaminants, 14(1), 7 – 10.

16- Pittet, A. 1998; Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds. An updated review.Revue de Medicine Veterinaire, 149(6), 479-492.

17- Purchase, Y.F.H. 1963; Acute toxicity of aflatoxins M_1 and M_2 in one-day-ducling. Food Cosmetic Toxicology, 5, 339-342.

18- Rothschild, L.J. 1992; IARC classes AFB_1 as class 1 human carcinogen. Food Chemistry, 34, 62-66.

19-Rostogi, S., Dwivedi, D. P., Khanna, K. S., & Das, M. 2004; Detection of aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. Food Control, 15, 287-290.

20- Rustom, I. Y. S. 1997; Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. Food chemistry, 59(1). 57-67.

21 - Sarimehmetoglu, B., Kuplulu, O., & Celik, T. H. 2004; Detection of aflatoxin M_1 in cheese samples by ELISA. Food Control, 15, 287-290.

www.SID.ir