

اندازه گیری میزان آفلاتوکسین M1 در شیر پاستوریزه تولیدی کارخانجات استان مازندران در نیمه اول سال ۱۳۹۰

محمد قلی پور^۱
لاله کریم زاده^۱
فرامرز علی نیا^۲
زین العابدین بابائی^۱

چکیده

سابقه و هدف: آفلاتوکسین B1 سمی ترین آفلاتوکسین می باشد که در خوراک دام در اثر رشد قارچها تولید می شود و از طریق خوراک دام وارد بدن دام شده و در کبد و کلیه پس از فعل و انفعالات شیمیایی و هیدروکسیلاسیون به آفلاتوکسین M1 تبدیل شده و از طریق شیر وارد بدن انسان می شود.

مواد و روشها: در مطالعه حاضر ۷۵ نمونه شیر پاستوریزه تولیدی کارخانجات استان مازندران در فصول بهار و تابستان سال ۱۳۹۰ از نظر آفلاتوکسین M1 به روش الیزا مورد سنجش قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین دادهها از آزمون t-test استفاده شد.

یافتهها: از ۷۵ نمونه مورد بررسی، در ۴ درصد نمونهها (۳/۷۵) میزان آفلاتوکسین پایین تر از حد شناسایی دستگاه بود. در حالی که در ۳۷/۳ درصد نمونهها (۲۷/۷۵) غلظت آفلاتوکسین M1 در حد مجاز تعیین شده کمیته اروپایی و غذایی کودکس بود. از طرفی ۶۲/۶۷ درصد نمونهها (۴۷/۷۵) دارای غلظت آفلاتوکسین M1 بالاتر از حد تعیین شده توسط کمیته اروپایی و غذایی کودکس بودند و ۱۲ درصد نمونهها (۹/۷۵) دارای غلظت آفلاتوکسین M1 بالاتر از حد مجاز استاندارد ملی ایران بوده اند. بالاترین میانگین آفلاتوکسین محاسبه شده مربوط به کارخانه شماره ۲۱ می باشد (۵۵/۹۷ نانوگرم در لیتر). همچنین میانگین آفلاتوکسین در کل نمونههای مثبت ۶۳/۸۴ نانوگرم در لیتر بود. تفاوت معنی داری بین میانگین آفلاتوکسین M1 در فصل بهار و تابستان وجود نداشت.

استنتاج: با توجه به شیوع بالای آلودگی، پایش منظم شیر تولیدی و کنترل علل اصلی آلودگی ضروری به نظر می رسد.

واژه های کلیدی: شیر پاستوریزه، آفلاتوکسین M1، الیزا

مقدمه

فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس و آسپرژیلوس نومیوس تولید می شود (۱).

مطالعات مختلف ارتباط خطی بین مقدار آفلاتوکسین M1 موجود در شیر گاو و میزان

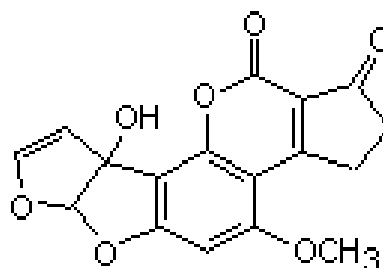
آفلاتوکسین M1 عامل سرطان کبد می باشد و در شیر حیواناتی که با خوراک دام آلوده به آفلاتوکسین B1 تغذیه می شوند، دیده می شود آفلاتوکسین B1 توسط قارچ جنس آسپرژیلوس، خصوصاً آسپرژیلوس

10P درصد می‌باشد بنابراین نمونه‌ایی به حجم ۷۵ برای اعتماد ۹۵ درصد و اشتباه ۹ درصد در نظر گرفته شد (۱۴). ۷۵ نمونه شیر پاستوریزه تولیدی کارخانجات سطح استان مازندران با تاریخ تولیدهای مختلف، به صورت تصادفی و در فصول بهار و تابستان سال ۱۳۹۰ جمع‌آوری گردید تا از نظر آفاتوکسین M1 مورد سنجش قرار گیرند. از هر کارخانه ۵ تا ۳ نمونه بر اساس حجم نمونه در دسترس تهیه شد. برخی کارخانه‌های شهرهای سوادکوه، محمود آباد، آمل، بابل، تنکابن، بهشهر، قائمشهر، شیرکامه نور و ساری مورد بررسی قرار گرفتند. سنجش آفاتوکسین از روش‌های متعددی میسر است مانند کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی مایع (LC)، ELISA (Enzyme Link)، Immuno sorbant Assay و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (۱۲، ۱۶). در این پژوهش نمونه‌ها به روش الیزا با سه تکرار مورد آزمون قرار گرفتند. میانگین آفاتوکسین محاسبه شده با حدود مجاز استاندارد ملی ایران ($p \leq 0.05$) مقایسه شد.

آماده سازی نمونه ها:

این نمونه‌ها در بسته‌بندی نایلونی، در حجم‌های ۰/۶ تا یک لیتر و با ۲/۵ درصد چربی بودند. با توجه به این که، ۱۰۰ میکرولیتر از لایه میانی بدون چربی برای آنالیز لازم است، ۵ میلی لیتر از هر نمونه شیر با سانتریفوژ یخچال‌دار، در دمای 5°C ، با دور ۲۵۰۰g و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد (نمونه‌های آماده شده را می‌توان تا زمان آنالیز در فریزر 40°C نگهداری کرد) (۱۷). دستگاه الیزا مورد استفاده Biotech-ELX 800 ساخت کشور آمریکا بود. کیت الیزا 96 تایی آفاتوکسین M1 از شرکت EuroproxFFima B.V (Amhem, 5121 Afm، هلند) تهیه شد. کمترین حد قابل شناسایی برای این روش ۶ نانوگرم بر لیتر بوده است. اندازه‌گیری میزان آفاتوکسین M1 با روش الیزا و بر اساس واکنش ایمنو آفینیتی رقابتی بین آنتی‌بادی

آفاتوکسین B1 موجود در خوراک این حیوانات نشان داده‌اند. همچنین مطالعات پیشین به روشی بیانگر اثرات سمی و سرطانزایی آفاتوکسین M1 می‌باشند، از این رو این سم توسط آژانس تحقیقات بر روی سرطان در WHO به عنوان گروه ۲ سرطان‌زای انسانی طبقه‌بندی شده است (۱). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که آفاتوکسین M1 در حیوانات نیز سرطان‌زا است (۲). تا وقتی که سطح آلودگی آفاتوکسین B1 در خوراک دام در حد ۲۰ ppb باشد، می‌توان انتظار داشت میزان آفاتوکسین M1 شیر آن دام در حد مجاز باشد ولی اگر آفاتوکسین B1 در خوراک دام بین ۲۰ ppb - ۳۰۰ باشد، از آن خوراک دام، برای خوراک خوک یا گاوهای گوشتی می‌توان استفاده کرد (۳). تحقیقات نشان می‌دهد سمیت حاد آفاتوکسین M1 به دلیل تأثیر آن در ممانعت از کد برداری RNA و سنتز پروتئین‌ها درست به اندازه آفاتوکسین B1 است ولی تأثیر آن بر DNA کمتر از آفاتوکسین B1 می‌باشد (۴، ۵).



تصویر شماره ۱: ساختمان شیمیایی آفاتوکسین M1

مواد و روش‌ها

با توجه به مطالعه مشابهی که در سندج صورت گرفت، میزان آلودگی به آفاتوکسین ۸۰ درصد بود ($p = 0.08$). با توجه به این که Z طبق جدول سطح احتمال آماری برابر ۱/۹۶ برای سطح اطمینان ۹۵ درصد است و p میزان درصد آلودگی به آفاتوکسین و d مقدار اشتباه مورد قبول در برآورد نسبت جامعه است که حداکثر

independent-sample T Test و Samplet-test انجام شد. سطح معنی داری، $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

به منظور حفظ حقوق تولیدکنندگان، برای هر کارخانه یک شماره به عنوان کد در نظر گرفته شده است. یافته‌های مربوط به توزیع فراوانی مطلق و فراوانی نسبی سطح آفلاتوکسین M1 در شیر پاستوریزه در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی مطلق و فراوانی نسبی سطح آفلاتوکسین M1 در شیر پاستوریزه تولیدی کارخانجات مازندران در نیمه اول ۱۳۹۰

فراوانی (درصد)	آفلاتوکسین M1 (نانوگرم بر لیتر)
۳ (۴)	۰
۳۳/۳۳ (۲۴)	۵۰-۱
۵۰/۶۷ (۳۹)	۱۰۰-۵۰
۹ (۱۲)	بالتر از ۱۰۰

از ۷۵ نمونه مورد بررسی، در ۴ درصد نمونه‌ها (۳/۷۵) میزان آفلاتوکسین کمتر از حد شناسایی دستگاه (۶ ng/l) بود. در حالی که در ۳۷/۳ درصد نمونه‌ها (۲۷/۷۵) غلظت آفلاتوکسین M1 در حد مجاز تعیین شده کمیته اروپایی و غذایی کودکس (۰-۵۰ نانوگرم در لیتر) بود. از طرفی ۶۲/۶۷ درصد نمونه‌ها (۴۷/۷۵) نمونه دارای غلظت آفلاتوکسین M1 بالاتر از حد تعیین شده توسط کمیته اروپایی و غذایی کودکس بودند و ۱۲ درصد نمونه‌ها (۹/۷۵) دارای غلظت آفلاتوکسین M1 بالاتر از حد مجاز استاندارد ملی ایران (۱۰۰ نانوگرم در لیتر) بوده‌اند. براساس جدول شماره ۲ که میانگین و انحراف معیار میزان آفلاتوکسین M1 به تفکیک کارخانه‌ها برحسب نانوگرم در لیتر را نشان می‌دهد بالاترین میانگین آفلاتوکسین محاسبه شده مربوط به کارخانه شماره ۲۱ می‌باشد (۹۷/۵۵). میانگین آفلاتوکسین در نمونه‌های مثبت ۶۳/۸۴ نانوگرم در لیتر

ویژه آفلاتوکسین M1 (که با تزریق به موش و از سرم به دست آمده) و آنتی ژن (آفلاتوکسین M1 موجود در نمونه یا استاندارد) سنجیده می‌شود، که آنتی‌بادی ویژه به دست آمده از سرم موش در چاهک تثبیت گشته است. در واقع آفلاتوکسین M1 موجود در نمونه یا استاندارد با جایگاه ویژه خود بر روی آنتی‌بادی ویژه خود در طی مرحله اول انکوباسیون پیوند می‌یابد، بعد از یک مرحله شستشو و قبل از انکوباسیون دوم آنتی ژن نشاندار شده (آنزیم کانژوگه) به درون چاهک‌ها اضافه می‌شود که طی انکوباسیون با جایگاه‌های خالی آنتی‌بادی‌ها باند می‌گردد در شستشوی مرحله دوم نیز آنتی ژن نشاندار اضافی حذف می‌گردند. با افزودن یک ترکیب سوبسترای آنزیم و رنگساز (Tetramethylbenzidine) یک محصول رنگی به دست آمد که با اضافه کردن عوامل متوقف کننده رنگ آبی به محلول زرد تبدیل می‌شود به وسیله اسپکتروفتومتر الیزا ریدر و در طول موج ۴۵۰ نانومتر جذب استاندارد و نمونه‌ها اندازه گیری گردید. ماکزیمم جذب برای استاندارد صفر می‌باشد و با تقسیم جذب استانداردها و نمونه‌ها بر جذب صفر، مقدار درصد ماکزیمم جذب محاسبه شد. درصد ماکزیمم جذب = $100 * (\text{جذب استاندارد صفر} / \text{جذب استاندارد (یا نمونه‌ها)})$ برای رسم منحنی استاندارد مقادیر ماکزیمم جذب محاسبه شده برای استانداردها روی محور Y را در برابر غلظت آفلاتوکسین M1 بر حسب نانوگرم در لیتر (ng/l) روی محور X رسم شد و با قرار دادن جذب نمونه‌ها در این منحنی غلظت آن‌ها محاسبه گشت. دامنه خطی در محدوده بین ۲۰۰-۶ ng/l بوده است (۱۳، ۱۷، ۱۸).

آنالیز آماری

داده‌ها وارد نرم‌افزار SPSS.16 شد و میانگین و انحراف معیار داده‌ها محاسبه گشت. مقایسه میانگین محاسبه شده با مقدار استاندارد و مقایسه میانگین ۲ نمونه مستقل (فصل‌ها) به ترتیب با استفاده از آزمون‌های One-

تولیدی مازندران انجام گرفت. نشان می‌دهند که ۹۶ درصد نمونه‌ها دارای آفلاتوکسین بودند و در ۶۲/۶۷ درصد نمونه‌ها غلظت آفلاتوکسین بالاتر از حد مجاز تعیین شده توسط کمیته اروپایی و غذایی کودکس بود. از طرفی پایین‌ترین میانگین آفلاتوکسین محاسبه شده بر حسب نانوگرم در لیتر مربوط به کارخانه شماره ۷ (۲۲/۱) و بالاترین میزان محاسبه شده مربوط به کارخانه شماره ۲۱ (۹۷/۵۵) بود. میانگین آفلاتوکسین کارخانه‌های ۲، ۵، ۷، پایین‌تر از حد مجاز بود در حالی که میانگین آفلاتوکسین محاسبه شده در کلیه نمونه‌های مورد بررسی کارخانه شماره ۸ پایین‌تر از از حد شناسایی دستگاه (۶ ng/l) بود.

در یک مطالعه که در بر روی ۵۴ نمونه شیر پاستوریزه تولیدی ۵ کارخانه مختلف مراکش که با استفاده از روش الیزا برای اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین M1 اجرا شد نتایج آنالیز نشان داد که ۸۸/۸ درصد از نمونه‌ها به آفلاتوکسین M1 آلوده بودند (۱۹). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۲ به روش HPLC بر روی ۴۴ نمونه شیر تازه در تایوان صورت گرفت، ۹۰/۹ درصد نمونه‌ها آلوده به آفلاتوکسین M1 بودند، ۹/۱ درصد نمونه‌ها فاقد آفلاتوکسین بودند، در ۸۸ درصد نمونه‌ها میزان آفلاتوکسین بسیار پایین بود (۰/۰۲ تا ۰/۰۵ میکروگرم در لیتر) و در هیچ کدام از نمونه‌ها میزان آفلاتوکسین M1 بالای حد مجاز (۵۰ نانوگرم در لیتر) نبود که بیانگر این امر است که میزان آلودگی پایین در شیر تجارتي می‌تواند به علت ورود یک حجم کوچک شیر آلوده به یک منبع بزرگ شیر باشد (۶). در مطالعه‌ای که به منظور اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین M1 بر روی ۱۵۳ شیر استریلیزه و ۲۶ نمونه شیر پاستوریزه در سال ۲۰۱۰ در چین به روش الیزا انجام شد، ۵۴/۹ درصد نمونه‌های شیر استریلیزه و ۹۶/۲ درصد نمونه‌های شیر پاستوریزه دارای آفلاتوکسین M1 با غلظت به ترتیب ۰/۱۶۰-۰/۰۰۶، ۰/۱۶۰-۰/۰۲۳ و ۰/۱۵۴-۰/۰۰۶ میکروگرم در لیتر بودند. ۲۰/۳ درصد نمونه‌های شیر استریلیزه و ۶۵/۴

بود که به طور معنی‌داری از حد مجاز توصیه شده توسط کودکس بالاتر بود ($p < 0/002$). همچنین میانگین آفلاتوکسین در کل نمونه‌های مثبت ۶۳/۸۴ بود. تفاوت معنی‌داری بین میانگین آفلاتوکسین M1 در فصل بهار و تابستان وجود نداشت (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۲: میانگین و انحراف معیار میزان آفلاتوکسین M1 بر حسب نانوگرم در لیتر در شیر پاستوریزه تولیدی کارخانجات مازندران در نیمه اول ۱۳۹۰ به تفکیک کارخانه

کد کارخانه	انحراف معیار ± میانگین
۱	۱۷/۷ ± ۵۶/۶۴
۲	۳/۲۶ ± ۴۲/۱۲
۳	۸/۶۴ ± ۶۲/۷۸
۴	۲۴/۸۷ ± ۶۶/۴۱
۵	۲۷/۴۸ ± ۸۰/۳۷
۶	۲۳/۰۱ ± ۶۵/۸۴
۷	۸/۸۶ ± ۲۲/۱
۸	ND*
۹	۱۰/۸۱ ± ۷۸/۴۲
۱۰	۳۵/۷۸ ± ۵۵/۳۶
۱۱	۱۹/۱ ± ۷۱/۹۷
۱۲	۱۳/۲۸ ± ۴۹/۹
۱۳	۱۰/۲۳ ± ۶۱/۷۷
۱۴	۳/۲۶ ± ۳۳/۴۸
۱۵	۱۹/۲۱ ± ۵۳/۰۷
۱۶	۱/۸۶ ± ۶۸/۵۴
۱۷	۲/۹۹ ± ۵۵/۵
۱۸	۳۸/۰۸ ± ۹۳/۸۹
۱۹	۵۶/۳۳ ± ۸۰/۴۷
۲۰	۱۹/۷۶ ± ۵۳/۵۷
۲۱	۲۱/۳۶ ± ۹۷/۵۵
۲۲	۳۰/۴۸ ± ۷۱/۶۲
کل نتایج مثبت ۶۳/۸۴ ± ۲۸/۱۹	

*ND: Not detected

جدول شماره ۳: فراوانی نمونه‌ها در هر فصل، میانگین و انحراف معیار میزان آفلاتوکسین M1 بر حسب نانوگرم در لیتر در شیر پاستوریزه تولیدی کارخانجات مازندران در نیمه اول ۱۳۹۰ به تفکیک فصل

فصل	فراوانی (درصد)	انحراف معیار ± میانگین
بهار	(۴۱/۳)۳۱	۶۰/۳۷ ± ۳۴/۶۶
تابستان	(۵۸/۷)۴۴	۶۱/۶۸ ± ۲۷/۵۷

بحث

نتایج مطالعه حاضر که بر روی شیرهای پاستوریزه

درصد نمونه‌های شیر پاستوریزه حاوی آفلاتوکسین به مقدار بالاتر از حد مجاز ۵۰ نانو گرم در لیتر بودند (۲۰). در مطالعه‌ای که در زمستان ۱۳۸۴ با نمونه‌برداری از سطح سوپر مارکت‌های شهر بابل بر روی ۳۳ نمونه شیر استریلیزه و ۷۸ نمونه شیر پاستوریزه (جمعاً ۱۱۱ نمونه) به عمل آمد نشان می‌دهد که میزان آلودگی صد در صد و میانگین آن‌ها ۲۳۰/۵ نانو گرم در لیتر (چهار برابر حد مجاز کدکس) بوده است (۱۵) که بسیار بالاتر از میانگین کل محاسبه شده در پژوهش حاضر (۶۹/۲۷ نانو گرم در لیتر) می‌باشد. در بررسی شیرهای خام جمع‌آوری شده مناطق مختلف کردستان و تهران به‌طور تصادفی ۸۴ نمونه انتخاب شدند بعد از آماده‌سازی نمونه‌ها اندازه‌گیری آفلاتوکسین M1 با روش الیزا انجام شد. مشخص گردید که ۷۷ نمونه (۹۱/۶۵ درصد) از کل نمونه‌ها به آفلاتوکسین M1 آلوده بوده‌اند (۱۴). در مطالعه‌ای که در به همین منظور در تهران بر روی ۲۱۰ نمونه شیر استریلیزه در تهران در ماه‌های اردیبهشت و خرداد (May) مرداد و شهریور (August)، آبان و آذر (November) و بهمن و اسفند (February) به روش الیزا انجام شد، ۵۵/۲ درصد نمونه‌ها حاوی آفلاتوکسین بودند و در ۳۳/۳ درصد نمونه‌ها میزان آفلاتوکسین محاسبه شده بالاتر از حد مجاز ۵۰ نانو گرم در لیتر بود. بالاترین غلظت در بهمن و اسفند (۸۷ نانوگرم در لیتر) و پایین‌ترین غلظت محاسبه شده مربوط به ماه مرداد و شهریور (۲۰ نانوگرم در لیتر) بود. تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های مربوط به ماه‌های بهمن - اسفند با اردیبهشت - خرداد و مرداد - شهریور دیده شد ($p < 0.01$) (۲۱). شیوع آلودگی به آفلاتوکسین M1 در مطالعه حاضر (۹۶ درصد) بالاتر از مطالعه‌های چین (۹۶ درصد)، مراکش (۸۸ درصد)، تایوان (۹۰/۹ درصد)، کردستان (۹۱/۶۵ درصد)، تهران (۵۵/۲ درصد) و پایین‌تر از مطالعه بابل (۱۰۰ درصد) بود. با توجه به این‌که مطالعات پیشین بیانگر آلودگی خوراک دام به آفلاتوکسین B1 بودند (۲۰) و از آنجایی که آلودگی

شیر به آفلاتوکسین M1 به دنبال تغذیه دام از علوفه آلوده به آفلاتوکسین B1 رخ می‌دهد می‌توان نتیجه گرفت که علت شیوع بالای آفلاتوکسین در نمونه‌های مورد بررسی می‌تواند آلودگی غذای دام باشد. اگرچه در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین فصل نمونه‌برداری و میزان آفلاتوکسین دیده نشد اما مطالعات مختلفی هم وجود دارند که بیانگر تأثیر فصل بر میزان آفلاتوکسین می‌باشند که احتمالاً علت اثرگذاری فصول، تأثیری است که بر نوع و کیفیت خوراکی که است که دام با آن تغذیه می‌شود. در پاییز و اوایل زمستان از خوراک ذخیره شده همانند غلات، محصولات فرعی و علف تازه مانده استفاده می‌شود (۲) همچنین در مطالعه تاج کریمی و همکاران که در ایران انجام شد بین آلودگی به آفلاتوکسین M1 و منطقه‌ای که علوفه تازه مانده تولید می‌شود ارتباط دیده شد (۲۲). آلودگی به آفلاتوکسین تحت تأثیر شرایط آب و هوایی فصل درو و شرایط ذخیره‌سازی خوراک دام قرار می‌گیرد. آلودگی به آفلاتوکسین در فصل گرم و مرطوب شایع است (۲۳). شرایط مرطوب و نسبتاً گرم مازندران احتمال رشد کپک‌ها و تولید توکسین را افزایش می‌دهد. از طرفی شیر خام مصرفی کارخانجات مازندران از شهرهای مختلف خارج از استان تهیه می‌شود. از این‌رو بررسی شیر خام استان‌های دیگر و شرایط تغذیه دام و نگهداری علوفه در تمامی مراکز فروش شیر خام ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به این‌که شیر خام مورد نیاز کارخانجات از دامداری‌های کوچک هم تهیه می‌شود، توجه به آموزش کشاورزان برای توجه به فرآیند مناسب کشاورزی برای ذخیره‌سازی علوفه تازه یکی از مهم‌ترین روش‌های کاهش آلودگی به آفلاتوکسین می‌باشد. همچنین بررسی‌های به عمل آمده نشان می‌دهد که در دامداری‌های صنعتی سطح آلودگی بسیار کمتر از واحدهای سنتی می‌باشد بنابراین توسعه واحدهای صنعتی می‌تواند کمک مؤثری برای کاهش سطح آفلاتوکسین M1 باشد. در حالی که مناطق شمالی

برای کاهش میزان آفلاتوکسین در شیر یافت شود. با توجه به این که پژوهش‌های مختلفی در زمینه بررسی آفلاتوکسین در شیر در ایران و دنیا انجام شده و با توجه به این که آلودگی به آفلاتوکسین در شیر شیوع بالایی دارد، بررسی علل و منابع آلودگی باید در اولویت قرار گیرد.

بیش از ۸۰٪ شیر به صورت سنتی تولید می‌شود (۱۰). از نکات قابل توجه این پژوهش این است که تمام نمونه‌های تهیه شده از کارخانه شماره ۸ میزان آفلاتوکسین پایین تر از حد شناسایی دستگاه بود. توجه به این که این کارخانه شیر مورد نیاز خود را از چه مراکزی دریافت می‌کند می‌تواند کمک نماید تا راهی

References

1. Tekinsen KK, Eken HS. Aflatoxin M1 levels in UHT milk and kashar cheese consumed in Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46: 3287–3289.
2. Marnissi B El, Belkhou R, Morgavi DP, Bennani L, Boudra H. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk collected from traditional dairies in Morocco. *Food and Chemical Toxicology* 2012; 50: 2819–2821.
3. Chopra RC, Chhabra A, Parsad KSN, Dudhe A, Hurthy TN, Pprasad T. Carryover of aflatoxin M1 in milk of cows fed aflatoxin B1 contamination ration. *Indian Journal of Animal Nutrition* 1999; 16:103-106.
4. D'Mello JPF, MacDonald AMC. Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 1997; 69: 155-66.
5. Lopez CE, Ramos LL, Ramadan SS, Bulacio Lo. Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina. *Food control* 2003; 14 (1): 31-34.
6. Lin LC, Liu FM, FU YM, Shih DYC. Survey of Aflatoxin M1 Contamination of Dairy Products in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis* 2004; 12(2): 154-160.
7. Kim EK, Shon DH, Ryu D, Park J W, Hwang H J, Kim YB Occurrence of aflatoxin M1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. *Food Addit. Contam* 2000; 17: 59-64.
8. Gourama H, Bluerman LB. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxingenic fungiof concern in foods and feeds: a review. *J. Food Prot* 1995; 58: 1395-1404.
9. Galvano F, Galofaro V, Galvan G. Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products. A worldwide review. *J. Food Prot.* 1996; 59:1079-1090
10. Quality engineering of food technology. Research about quantity and quality of raw milk delivered to dairy industries in Mazandaran province. 1th ed. Sari; Quality Engineering of food technology; 2009.
11. Borji M. Reductions of aflatoxin M1 in milk utilizing some chemisorption compounds and study their effects on milk composition. *Pajouhesh & Sazandegi*; 2005; 74: 19-26.
12. Codex Alimentarius Commissions. Comments submitted on the draft maximum level for Aflatoxin M1 in milk. Codex committee on food additives and cotaminants. 33rd sessions, Hauge, The Netherlands: 2001. Available from: [http://www.ecolomicsinternational.org/cad_codex_alimentarius_evaluation_report_2002].
13. Institute of standards and Industrial Research of Iran. *Food & Feed –Mycotoxins-Maximum tolerated level*; NO.5925.1th ed. Tehran: ISIRI, 2002.
14. Hazhir MS, Sanoubar Tahaiee N, Rashidi K, Rezaie R, Shaykhi H. Determination of the

-
- amount of aflatoxin in milk samples delivered to Sanandaj pasteurized Milk Corporation Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 2008; 13 (1):44-50.
15. Gholampour Azizi I, Khoushnevis SH, Hashemi SJ. Aflatoxin M1 level in pasteurized and sterilized milk of Babol city. TUMJ 2007; 65(1): 20-24.
 16. Rastogi S, Dwivedi DP, Khanna KS, Das M. Detection of aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. Food Control 2004; 15: 287-90.
 17. A competitive enzyme immunoassay for quantitative analysis of Aflatoxin M1 in sample of milk and milk products. Available from: <http://europroxima.com/products/contaminants-and-residues/mycotoxins-elisa/aflatoxin-M1-elisa/>
 18. Institute of standards and Industrial Research of Iran. Milk and milk products - Guidelines for a standardized description of competitive enzyme immunoassays - Determination of aflatoxin M1 content; NO.14675.1th ed. Tehran: ISIRI, 2003.
 19. Zinedine A, Gonzalez-Osnaya L, Soriano JM, Molto JC, Idrissi L, Manes J. Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. Journal of food microbiology 2007; 114 (1):25- 29.
 20. Zheng N, Sun P, Wang JQ, Zhen YP, Han RW, Xu XM. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk and pasteurized milk in China market. Food Control 2013; 29: 198-201.
 21. Heshmati A, Jafar M, Milani b. Contamination of UHT milk by aflatoxin M1 in Iran. Food Control 2020; 21: 19–22.
 22. Tajkarimi M, Shojae Aliabadi F, Salah Nejad M, Pursoltani H, Motallebi AA, Mahdavi H. Seasonal study of aflatoxin M1 contamination in milk in five regions in Iran. International Journal of Food Microbiology 2007; 116: 346–349.
 23. Cotty, PJ, Jaime-Garcia R. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. International Journal of Food Microbiology 2007; 119: 109–115.