نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره هفدهم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۰،
پیاپی ۴۳ : ۹-۱

مقاله پژوهشی

بررسی میزان آفلاتوکسین B1 خوراک دام وآفلاتوکسین M1 شیر خام به روش الایزا و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

شهین عشقی[۱]، جمیله سالار آملی[۲*]، کامران میرزایی[۳]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی سم شناسی، دپارتمان سم شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- استاد گروه سم شناسی، دپارتمان سم شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳ -دانش آموخته دکتری تخصصی اپیدمیولوژی، سازمان دامپزشکی کشور، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۳۰

چکیده

قارچ‌های آسپرژیلوس‌فلاووس، پارازیتیکوس و نومیوس از مهمترین گونه‌های مولد آفلاتوکسین‌های B1, B2, G1, G2 در مواد غذایی می‌باشند. آفلاتوکسین‌های M1 و M2 متابولیت‌های هیدروکسیله شده آفلاتوکسین‌های B1 و B2 هستند. هدف از این مطالعه بررسی میزان آفلاتوکسین B1 در جیره مصرفی دام و ارتباط آن با میزان آفلاتوکسین M1 در شیرخام تولیدی می‌باشد. ۲۰ گاوداری صنعتی و ۲۰ گاوداری نیمه صنعتی استان انتخاب و از خوراک و شیر خام تولیدی هر دامداری بطور مجزا نمونه برداری بعمل آمد. میزان آفلاتوکسین B1 در خوراک و M1 در شیر توسط تست الایزا رقابتی و نمونه‌هایی دارای مقادیر بالاتر از حد مجاز، جهت تایید نهایی، توسط تست کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه گیری شدند. نتایج حاصل از روش الایزا نشان داد که ۳۵درصد از خوراک مصرفی گاوداری‌های صنعتی و ۷۵ درصد از خوراک مصرفی گاوداری‌های نیمه صنعتی آلوده به آفلاتوکسین B1 می‌باشد که از این میزان به ترتیب ۵ درصد و ۱۵درصد از خوراک گاوداری‌های صنعتی و نیمه صنعتی دارای مقادیر بالاتر از حد مجاز می‌باشد. همچنین در ارزیابی میزان آفلاتوکسین M1 شیرهای تولیدی مشخص گردید آفلاتوکسین M1 تنها در شیر گاوداری‌هایی مشاهده می‌شود که از نظر آفلاتوکسین B1 مثبت بوده اند و این میزان در گاوداری‌های صتعتی و نیمه صنعتی به ترتیب ۲۰ و ۵۵ درصد بود ($P<۰/۰۵$). قابل ذکر است نمونه شیرهایی که دارای مقادیر بالاتر از حد مجاز بودند توسط تست تاییدی HPLC مورد سنجش قرار گرفتند که مشخص گردید هیچ یک از نمونه شیرهای تولیدی گاوداری‌های صنعتی و نیمه صنعتی دارای مقادیر بالاتر از حد مجاز نمی‌باشد. به دلیل اهمیت مصرف سرانه شیر در رژیم غذایی جامعه و از طرفی خطرات ناشی از وجود آفلاتوکسین M1 در آن، نظارت گسترده و دقیق بر روی مراکز تولید و عرضه شیر و همچنین کارخانجات تولید کننده محصولات لبنی ضروری است.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین، شیر، خوراک دام، الایزا، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

*نویسنده مسئول: جمیله سالار آملی

آدرس: دپارتمان سم شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

پست الکترونیک: jsalar@ut.ac.ir

مقدمه

امروزه آلودگی مواد غذایی به ویژه فرآورده‌های دامی و کشاورزی با انواع کپک‌ها از مهمترین مشکلات می‌باشد. طبق محاسبات سازمان غذا و خواربار جهانی ۲۵ درصد از محصولات کشاورزی در جهان با کپک و انواع مایکوتوکسین‌ها آلوده هستند. مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه قارچ‌ها هستند که ممکن است دارای اثرات سمی، سرطان‌زایی، جهش‌زایی و ناقص الخلقه زایی باشند. آفلاتوکسین ها گروهی از مایکوتوکسین‌ها هستند که توسط قارچ‌هایی بنام *آسپرژیلوس فلاوس*، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و *آسپرژیلوس نومیوس* تولید می شوند و این گروه از قارچ ها به راحتی در خلال رشد و انبار داری مواد غذایی به وجود می‌آیند. (۸،۱۱،۲۱). حداقل ۱۷ نوع آفلاتوکسین در طبیعت شناخته‌اند که در بین آن‌ها آفلاتوکسین‌های B1, B2, G1, G2 مهمتر هستند (۹). کمی پس از کشف آفلاتوکسین‌های جدا شده از مواد غذایی، محققین پیشنهاد کردند که احتمال وقوع باقیمانده‌های آفلاتوکسینی در شیر و دیگر فرآورد ه‌های حیوانی تهیه شده از دام هایی‌که از مواد غذایی آلوده به آفلاتوکسین تغذیه کرده‌اند وجود دارد لذا پس از جداسازی این سم در شیر، آفلاتوکسین M1 نام گرفت (۲۰،۲۲). اکثر تحقیقات میزان تبدیل آفلاتوکسین B1 موجود در جیره به آفلاتوکسین M1 را بین ۴-۱ درصد اعلام کرده‌اند (۲،۱۹)، ولی نسبت‌های تبدیل حتی تا ۶ درصد نیز در مصارف بالای روزانه سم آفلاتوکسین B1 گزارش شده است به طور خلاصه می‌توان گفت که خطرناکترین آفلاتوکسین که همان نوع B1 است در میکرزومال‌های کبدی و با دخالت اکسیدازهای چند کاره توسط گاوهای شیری عمدتاً به مشتق ۴-هیدروکسی خود تبدیل شده و آفلاتوکسین M1 را به وجود می‌آورد (۵،۱۳). اگر چه روش‌های کاملاً قابل اعتمادی که بتوانند تضمینی را در زمینه جلوگیری کامل از آلودگی‌های آفلاتوکسینی محصولات کشاورزی ارائه دهند وجود ندارند، اما به طور کلی فرآیند های سم زدایی شامل کاهش سم، تخریب ساختمانی سم یا غیر فعال سازی سموم آفلاتوکسینی می‌باشد (۱،۱۷). نتایج تحقیقات انجام شده نشان داده که یکی از مهمترین شیوه‌ها در کاهش بروز اختلالات مربوط به سموم آفلاتوکسینی جلوگیری از ورود این سموم در شیر، گوشت و تخم مرغ با استفاده از مواد جاذب سم می‌باشد (۱۷). آخرین ارزیابی حد مجاز آفلاتوکسین M1 نیز توسط کمیته تخصصی مشترک مواد افزودنی مواد غذایی سازمان جهانی بهداشت (Joint FAO/WHO expert committee on food additives (ECFA)) در سال 2001 انجام پذیرفته است. بر اساس استاندارد FDA آمریکا و نیز استاندارد کدکس الیمنتاریوس حداکثر مجاز باقیمانده آفلاتوکسین M1 در شیر ۰/۵ ppb و آفلاتوکسین B1 در خوراک دام ۵ ppb می‌باشد (۹،۱۴،۱۹).

برای اندازه گیری آفلاتوکسین، روش‌های متفاوت ایمونواسی و اندازه گیری کمی وجود دارند. استفاده از روش‌های ایمونواسی مانند ELISA برای انجام آزمون‌های غربالگری و نیز پایش در زمینه شیر و فرآورده‌های آن و همچنین مواد غذایی و خوراک دام و طیور توصیه می‌شود. نکته مهم در زمینه استفاده از روش‌های ایمونواسی، انجام تایید آزمون با استفاده از روش‌های اندازه گیری کمی مانند کروماتوگرافی با لایه نازک (TLC) (۱۵،۱۶) و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (۳،۴) می‌باشد. امروزه روش الایزا به دلیل سرعت، دقت و حساسیت بالا بیشتر مورد

استفاده قرار می‌گیرد. هدف از این مطالعه ارزیابی کمی میزان آفلاتوکسین B1 در خوراک دام و ارتباط آن با میزان آفلاتوکسین M1 در شیر خام تولیدی در گاوداری‌های صنعتی و نیمه صنعتی استان قزوین می باشد.

مواد و روش کار

نمونه برداری

در این تحقیق از جیره کاملاً مخلوط (Total Mixed Ration (TMR)) مصرفی دام و شیر خام تولیدی ۲۰ گاوداری صنعتی و ۲۰ گاوداری نیمه صنعتی استان قزوین در فصل زمستان سال ۱۳۹۹ بصورت تصادفی نمونه برداری بعمل آمد. از هر گاوداری میزان ۱ کیلوگرم از نمونه TMR و میزان ۱۰۰ میلی لیتر شیر خام از تانکر ذخیره شیر، نمونه برداری گردید. نمونه‌های شیر در ظروف مخصوص اخذ و در کنار یخ خشک و حداکثرظرف مدت ۴-۲ ساعت (با توجه به دور بودن مراکز از آزمایشگاه) به آزمایشگاه منتقل شدند.

آماده سازی و عصاره گیری از نمونه‌های TMR

بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت الایزا، بعد از همگن سازی نمونه‌های خوراک، مقدار مشخصی از نمونه‌های آسیاب گردید. ۲ گرم از نمونه آسیاب شده با ۳ میلی لیتر آب مقطر و ۲۰۰ میکرولیتر آنزیم آلفا آمیلاز مخلوط و به مد ت ۲۰ د قیقه در دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد) انکوبه گردید، سپس ۷ میلی لیتر متانول خالص به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۲ دقیقه ورتکس گردید. در نهایت عصاره نمونه‌ها به کمک فیلترهای کاغذی استخراج شد. ۲ میلی متر از عصاره به دست آمده با ۲ میلی لیتر آب مقطر و ۳ میلی لیتر دی کلرومتان مخلوط و به یک لوله سانتریفیوژ انتقال داده شد و سپس در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد و دور ۳۵۰۰ RCF بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. لایه رویی دور ریخته شد و لایه زیرین به یک لوله آزمایش منتقل گردید. جهت تبخیر ماده دی کلرومتان، محتویات لوله آزمایش به دستگاه روتاری اواپوریتور (تقطیر در خلاء) و در مجاورت گاز نیتروژن در درجه حرارت ۶۰-۵۰ درجه سانتیگراد منتقل گردید تا دی کلرومتان موجود تبخیر شود. به رسوب باقیمانده ۱ میلی لیتر متانول خالص و ۱/۵ میلی لیتر هپتال اضافه و در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد و دور ۱۵۰۰ RCF بمدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از لایه متانول با ۴۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده رقیق کیت گردید (نسبت ۱:۴). ۵۰ میکرولیتر از این محلول برای تست الایزا استفاده گردید.

شیر خام

به منظور آماده سازی نمونه‌های شیر خام، بر اساس دستورالعمل شرکت شازنده کیت الایزا، مقدار ۱۰ میلی لیتر از هر نمونه شیر به یک لوله آزمایش انتقال و در دمای ۴ درجه سانتیگراد و با سرعت ۲۰۰۰ RCF و به مدت ۱۵دقیقه سانتریفوژ گردید لایه چربی رویی توسط پیپت پاستور حذف شده و از مایع زیرین برای آزمایش ELISA و HPLC مورد استفاده قرار گرفت.

روش‌های سنجش آفلاتوکسین

روش ELISA

جهت اندازه گیری میزان آفلاتوکسین B1 در TMR و آفلاتوکسین M1 در شیر خام از کیت-Europroxima Netherlands استفاده گردید. کلیه نمونه‌های TMR و شیر خام ابتداء بر حسب محل و زمان نمونه برداری لیبل گذاری و سپس بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آماده سازی گردیدند. سپس از کیت الایزای ۹۶ تایی آفلاتوکسین که یک روش ایمونوآسی آنزیمی رقابتی

که بر پایه واکنش آنتی ژن آنتی بادی می‌باشد، استفاده گردید. در این تکنیک چاهک‌های میکروپلیت با آنتی بادی ضد آفلاتوکسین پوشانده شده است. با اضافه کردن آفلاتوکسین استاندارد (موجود در کیت) یا موجود در نمونه به چاهک، جایگاههای اتصال آنتی بادی با آفلاتوکسین بانده شده و مکان‌های خالی باقیمانده در مرحله بعد به وسیله توکسین لیبل شده با آنزیم کونژوگه پر می‌شوند. پس از شستشوی چاهک‌ها، جهت تشکیل کمپلکس رنگی، سوبسترای آنزیم و کروموژن به چاهک‌ها اضافه شده و در دمای اتاق انکوبه شدند. در نهایت با اضافه کردن محلول متوقف کننده، کمپلکس رنگی از آبی به زرد تغییر یافته و جذب نوری هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط یک الایزا ریدر قرائت گردید. پس از رسم منحنی استاندارد، غلظت سم آفلاتوکسین در نمونه‌ها محاسبه گردید. کمترین حد تشخیص کیت بر اساس ادعای شرکت سازنده، برای آفلاتوکسین B1 ۱ میکروگرم در کیلوگرم (ppb) و برای آفلاتوکسین M1 ۵ نانوگرم در لیتر (ppt) می باشد.

روش HPLC

در این روش از کروماتوگرافی فاز معکوس با شناساگر فلورسنس Water ۲۴۷۵ با تحریک پذیری ۳۶۰ نانومتر و با خروجی ۴۴۰ نانومتر استفاده گردید. ستون‌های مورد نیاز ODS (اکتا دسیل سیلان) ۴/۶ × ۲۵۰ میلی متر به اضافه ستون محافظ بودند. سرعت عبور فاز متحرک توسط پمپ Water۱۵۲۵ به میزان ۸/. milt/min بود. قبل از انجام کار خطی بودن منحنی کالیبراسیون و پایداری سیستم کروماتوگراف چک شد. به دفعات زیاد غلظت ثابتی از آفلاتوکسین تزریق تا ارتفاع و سطح زیر منحنی ثابتی از سم با تفاوت ۵± درصد به دست آمد. جهت ترسیم منحنی کالیبراسیون غلظت‌های متفاوت و متوالی ۵، ۲/۵، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲، ۰/۱ نانوگرم بر میلی لیتر از محلول استاندارد آفلاتوکسین M1 تهیه و تزریق شد و با توجه به سطح زیر نمودار، منحنی کالیبراسیون ترسیم شد. با توجه اینکه ۱۰۰ میکرولیتر از لایه میانی بدون چربی برای آنالیز لازم است، همانند روش الایزا، از هر نمونه ۵ میلی لیتر شیر برداشته و توسط سانتریفوژ یخچال‌دار، در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور g ۲۰۰۰ و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید (نمونه‌های آماده شده را می توان تا زمان آنالیز در فریزر ۴۰- درجه سانتیگراد نگهداری کرد) سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول آماده شده به دستگاه تزریق شد. برای صحت داده‌ها بعد از هر ۱۰ تزریق یک غلظت از محلول کالیبره تزریق شد. با توجه به سطح زیر منحنی پیک و قرار دادن در منحنی کالیبراسیون غلظت سم بر حسب نانوگرم بر میلی لیتر مشخص شد. غلظت واقعی سم آفلاتوکسین M1 در نمونه های مثبت مشخص گردید(۱۴).

تحلیل آماری

به منظور مقایسه میزان آفلاتوکسین نمونه ها از نسخه ۱۸ نرم افزار SPSS و برای مقایسه میزان آلودگی بین گاوداری‌های مختلف از آزمون مربع کای استفاده گردید.

نتایج

TMR

در این مطالعه مجموعاً ۴۰ نمونه خوراک مصرفی TMR از ۴۰ گاوداری‌های صنعتی و نیمه صنعتی اخذ و در مرحله اول جهت ارزیابی کلی وجود سم آفلاتوکسین B1، توسط روش الایزا مورد غربالگری قرار گرفتند. میانگین مقدار آفلاتوکسین B1 در نمونه هایی خوراک گاوداری های صنعتی ۳/۱۹۵ نانوگرم در گرم و در گاوداری‌های نیمه صنعتی ۸/۶۱۸ نانوگرم در گرم بود. از هر ۲۰ نمونه خوراک جمع

آوری شده از گاوداری صنعتی تنها ۱ مورد (۵ درصد) و در گاوداری نیمه صنعتی ۳ مورد (۵ درصد) دارای مقادیر بالاتر از حد مجاز استاندارد سازمان دامپزشکی کشور بودند (جدول-۱).

جدول ۱ - تعداد و درصد فراوانی میزان آفلاتوکسین B1 در نمونه خوراک‌های اخذ شده به روش ELISA

محل نمونه برداری	تعداد نمونه	SD ±میانگین (ppb)	حد پایین (ppb)	حد بالا (ppb)	تعداد موارد بالاتر از حد مجاز	درصد موارد بالاتر از حد مجاز
گاوداری صنعتی	۲۰	۳/۱۹۵±۰/۲۶۷	<LOD*	۱۳/۴۹۲	۱	۵
گاوداری نیمه صنعتی	۲۰	۸/۶۱۸±۰/۰۷۶	۱/۶۳۵	۲۲/۱۸۵	۳	۱۵

*کمترین حد تشخیص کیت ۱ نانوگرم در گرم (ppb) می باشد.

از نظر آماری بیشترین میزان آلودگی نمونه خوراک‌های جمع آوری شده به سم آفلاتوکسین B1 مربوط به گاوداری‌های نیمه صنعتی با ۷۵ درصد (۷ گاوداری) آلودگی می باشد که از این نظر نسبت به گاوداری‌های صنعتی دارای اختلاف معنی داری می باشد (P<۰/۰۵).

شیر خام

میانگین آفلاتوکسین M1 در نمونه شیرهای جمع آوری شده از تانکر ذخیره شیر گاوداری‌های صنعتی ۰/۱۳۵ نانوگرم در میلی لیتر و در گاوداری‌های نیمه صنعتی ۰/۴۱۸ نانوگرم در میلی لیتر بود. از مجموع نمونه‌های اخذ شده از گاوداری‌های نیمه صنعتی تنها در ۲ مورد (۱۰درصد) مقادیر آفلاتوکسین بالاتر از حد مجاز مشاهده گردید. در حالیکه در نمونه شیرهای گاوداری‌های صنعتی در هیچ یک از نمونه‌ها، مقادیر بالاتر از حد مجاز سازمان دامپزشکی کشور (۰/۵ ppb) مشاهده نگردید (جدول-۲).

جدول ۲ - تعداد و درصد فراوانی میزان آفلاتوکسین M1 در نمونه شیر های اخذ شده به روش ELISA

محل نمونه برداری	تعداد نمونه	SD ±میانگین (ppb)	حد پایین (ppb)	حد بالا (ppb)	تعداد موارد بالاتر از حد مجاز	درصد موارد بالاتر از حد مجاز
گاوداری صنعتی	۲۰	۰/۱۳۵±۰/۰۳۴	<LOD	۰/۳۸۹	۰	۰
گاوداری نیمه صنعتی	۲۰	۰/۴۱۸±۰/۰۷۶	<LOD	۱/۳۵۷	۲	۱۰

*کمترین حد تشخیص کیت ۵ نانوگرم در لیتر (ppt) می باشد.

بحث

قارچ‌های توکسین‌زا به دنبال رشد و تکثیر در مواد غذایی، توکسین تولید کرده و کیفیت بهداشتی آن را تحت تاثیر قرار می‌دهند. بنابراین برای تامین سلامت مصرف کنندگان لازم است وجود و مقدار مایکوتوکسین‌های مختلف در مواد غذایی به طور دایم اندازه گیری شده و برای به حداقل رساندن آنها در زنجیره غذایی برنامه ریزی شود(۱۱). بدلیل اینکه عواملی مختلفی مثل فصل، دما، رطوبت و نوع ماده غذایی در رشد قارچ ها و تولید مایکوتوکسین ها در غذای د ام نقش قابل توجهی د ارند(۸،۱۸). لذا حضور انواع مایکوتوکسین‌ها از فصلی تا فصل دیگر و از محلی به محل دیگر کاملا متفاوت است. اگرچه آفلاتوکسین‌ها اصولا به عنوان یک مشکل بعد از برداشت محصول و ناشی از نگهداری نا مناسب می‌باشد، اما آلودگی محصولات به مایکوتوکسین‌ها در خلال رشد فعال گیاه در انبار مزرعه نیز اتفاق می‌افتد. بر اساس مطالعات انجام شده در کشورهای مختلف،

میزان آلودگی به آفلاتوکسین در ژاپن ۱۴درصد، ترکیه ۱۲/۴ درصد و اسپانیا ۸/۴ درصد گزارش گردیده است. در ایران نتایج مطالعات بسته به زمان، نوع نمونه و محل نمونه برداری متفاوت و از ۷ تا ۸۴ درصد متفاوت بوده است(۸).

در خصوص ارتباط میزان آفلاتوکسین در خوراک و شیر تولیدی باید گفت که ارتباط مستقیمی بین حضور آفلاتوکسین M1 درشیر و آفلاتوکسین B1 در خوراک دام وجود دارد. نمونه‌هاییکه بین ۰/۳ تا ۶/۲ درصد از آفلاتوکسین B1خورده شده توسط دام، به صورت آفلاتوکسین M1 از شیر خام دفع می‌شود (۱۰،۱۱). به استناد نتایج حاصل از این مطالعه، وجود سم آفلاتوکسین M1 تنها در شیر گاوداری‌هایی مشاهده شد که خوراک مصرفی آنها آلوده به سم آفلاتوکسین B1 بود و در شیر بقیه دامداری‌ها مشاهده نگردیدکه این خود دلالت بر ارتباط مستقیم وجود آفلاتوکسین M1 و B1 می‌باشد. از طرفی در خوراک مصرفی تعدادی از گاوداری‌ها، باوجودیکه سم آفلاتوکسن B1 شناسایی شده بود اما در شیر تولیدی مقادیر آفلاتوکسین M1 یا مشاهده نشد یا بسیار کمتر از حد مجاز بود که این خود نیز دلالت بر فعالیت بیولوژیکی سیستم ایمنی بدن دام در خنثی یا دتوکسیفیکاسیون سم می‌باشد. حداکثر قابل قبول آفلاتوکسین M1 در شیر و محصولات لبنی در سراسر جهان بسته به شرایط و قوانین هر کشور تنظیم و اجرا می‌شود و این میزان ممکن است از کشوری به کشور دیگر متغیر باشد. در ایران نیز با توجه به متولی بودن سازمان دامپزشکی کشور در امر بهبود و کنترل کیفی شیر خام، حداکثر مجاز سم آفلاتوکسین M1 در شیر خام ۰/۵ نانوگرم در میلی لیتر ذکر شده است.

گزارشات مختلفی در مورد شیوع آلودگی نمونه‌هایی شیر به آفلاتوکسین M1 وجود دارد و مطالعات قبلی در ایران نیز در بیشتر موارد، درصد بالایی از آلودگی را نشان داده اند. به طوری که کریم و همکاران، در مطالعه‌ای ۸۲/۲ درصد و در مطالعه‌ای دیگر ۹۲/۳ درصد نمونه‌هایی شیر تهران را آلوده به آفلاتوکسین M1 گزارش کردند و مطالعه کامکار در سال ۱۳۸۴ در شهر سراب نشان داد که ۷۶٪ نمونه‌هایی شیر آزمایش شده به این مایکوتوکسین آلوده هستند (۷).

آلودگی غذای دام به آفلاتوکسین B1 (پیش ساز آفلاتوکسین M1) مهمترین عامل آلودگی شیر به آفلاتوکسین M1 محسوب می‌شود وحضور آفلاتوکسین B1 در علوفه خود نشانگر فراهم بودن شرایط برای رشد قارچ‌ها و تولید این مایکوتوکسین است. در فصول سرد برای تغذیه دام‌های شیری به جای علوفه تازه معمولاً از علوفه انبارشده و غذاهای صنعتی استفاده می‌شود که احتمال رشد قارچ‌ها و ایجاد آفلاتوکسین‌ها از جمله آفلاتوکسین B1 در آن‌ها بیشتر است و نتیجتاً حضور آفلاتوکسین M1 در شیر را به دنبال دارد. از طرفی پتانسیل خطرات احتمالی آفلاتوکسین‌ها بویژه B1 و M1 برای انسان در اثر محصولات کشاورزی و مصرف شیر توسط چندین محقق به اثبات رسید ه است (۲۰). خطرات آن در سلامت انسان به خصوص در سرطان کبد از طریق شیر و محصولات شیری بسیار با اهمیت است. در یونان Markaki و Melissari با استفاده از ELISA و HPLC آفلاتوکسین M1 را از شیر پاستوریزه تجاری مغازه‌ها را مورد سنجش قرار دادند. از ۸۱ نمونه شیر ۳۲ مورد شیر بین ۲/۵-۲ نانوگرم بر لیتر و ۳۱ مورد بین ۰/۵-۱ نانوگرم بر لیتر و ۹ مورد بیش از ۵ نانوگرم بر لیتر آفلاتوکسین داشتند و ۹ مورد شیر نیز بدون آفلاتوکسین بودند (۱۲) و همچنین در مطالعه Panariti شیرهای سر شیر گرفته یا نیمه سر شیر گرفته آلودگی کمتری نسبت به همان

شیرها داشتند. در مطالعه Gurbay به وسیله HPLC از ۲۷ نمونه شیر ۵۹/۳ درصد آلوده بودند که فقط یک نمونه بیش از حد مجاز اتحادیه اروپا و کودکس الیمانتاریوس بود (۶). در بررسی کامکار در شهر سراب از ۱۱۱ نمونه شیر خام ۸۵ مورد (۷۶/۶ درصد) با غلظت بین ۰/۰۱۵ و ۰/۲۸ نانوگرم برمیلی لیتر آلودگی داشتند و میزان ۴۰ درصد نمونه‌های مثبت بالاتر از حد مجاز اتحادیه اروپا (۰/۰۵نانوگرم بر میلی لیتر) بودند (۷). اگر چه پیشگیری از تشکیل آفلاتوکسین در جیره غذایی قبل از برداشت محصول در مزارع به علت رطوبت و حرارت بالا، مشکل می‌باشد، ولی با ذخیره صحیح و مناسب این محصولات در کاهش تولید آفلاتوکسین تا حد زیادی به نتایج مفیدی می توان دست یافت (۲۱).

نتیجه گیری

با وجودیکه میزان آلودگی به سم آفلاتوکسین B1 در نمونه خوراک‌های جمع آوری شده از گاوداریهای نیمه صنعتی از نظر تعداد به مراتب بالاتر از گاوداریهای صنعتی تعیین گردید، ولیکن میزان آلودگی شیر به سم آفلاتوکسین M1 در کلیه نمونه های جمع آوری شده از گاوداری‌های صنعتی و نیمه صنعتی، مقادیر پایین تر از حد مجاز مصرف را نشان دادند. ضمناً در هیچ یک از نمونه ها، مقادیر بالاتر از حد مجاز استاندارد سازمان دامپزشکی کشور (۲۰ نانوگرم در گرم) مشاهده نگردید.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از کلیه همکاران اداره دامپزشکی شهرستان قزوین و آزمایشگاه مرجع کنترل کیفی مواد غذایی قزوین، بویژه جناب آقای دکتر رضا نوریان که در هماهنگی، مشاوره و انجام امور پایان نامه کمال همکاری را با بنده داشتند کمال تشکر را دارم.

منابع

1. Akbar, N., Nasir, M., Naeem, N., Ahmad, M.-U.-D., Iqbal, S., Rashid, A., Imran, M., Aslam Gondal, T., Atif, M., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Martorell, M., Cho, W. C. (2019). Occurrence and Seasonal Variations of Aflatoxin M(1) in Milk from Punjab, Pakistan. *Toxins (Basel)*, **11**: 574.
2. Aycicek, H., Aksoy, A., Saygi, S. (2005). Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. *Food Control*, **16**: 263-266.
3. 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.
4. Behfar, A., Nazari Khorasgani, Z., Alemzadeh, Z., Goudarzi, M., Ebrahimi, R., Tarhani, N. (2012). Determination of aflatoxin m1 levels in produced pasteurized milk in ahvaz city by using HPLC. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, **7**: 80-84.
5. D'Mello, J. P. F., Macdonald, A. M. C. (1997). Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, **69**: 155-166.
6. Gürbay, A., Aydın, S., Girgin, G., Engin, A. B., Şahin, G. (2006). Assessment of aflatoxin M1 levels in milk in Ankara, Turkey. *Food Control*, **17**:1-4.
7. Kamkar, A. (2005). A study on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control*, **16**: 593-599.
8. Kohian, K., Glogahi, H., Akbari, M. (2012). Evaluation of aflatoxin B1 and M1 levels in a number of foods available in food warehouses of Nezaja units in Tehran in 2011. *Nurse doctor battle*, **12**: 12-14.
9. Lopez, C., Ramos, L., Ramadan, S., Bulacio, L., Perez, J. (2001). Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially

10. Mahmoudi, R., Golchin, A., Hoosseinzadeh, N., Ghajarbeygi, P. (2014). Aflatoxin M1 and B1 contaminations in products of animal origin in Iran. *The Journal of Qazvin University of Medical Sciences*, **18:** 49-59.
11. Mahmoudi, R., Norian, R. (2015). Aflatoxin B1 and M1 contamination in cow feeds and milk from Iran. *Food and agricultural immunology*, **26**: 131-137.
12. Markaki, P., Melissari, E. (1997). Occurrence of aflatoxin M1 in commercial pasteurized milk determined with ELISA and HPLC. *Food Additives & Contaminants*, **14**: 451-456.
13. Nakajima, M., Tabata, S., Akiyama, H., Itoh, Y., Tanaka, T., Sunagawa, H., Tyonan, T., Yoshizawa, T., Kumagai, S. (2004). Occurrence of aflatoxin M1 in domestic milk in Japan during the winter season. *Food Additives & Contaminants*, **21:** 472-478.
14. Norian, R., Mahmoudi, R., Porfarzaneh, A., Mashatian, F., Kaboudari, A., Rahimi Pir Mahalleh, S. F., Katiraee, F. (2015). Determination of aflatoxin M1 levels in raw milk samples using ELISA and high-performance liquid chromatography in Qazvin, Iran. *Journal of Mycology Research*, **2**: 41-48.
15. Park, D. (2002). Effect of Processing on Aflatoxin. In DeVries J, Trucksess M, Jackson L (Eds.), *Mycotoxins and Food Safety* (Vol. 504, pp. 173-179): Springer US.
16. Rastogi, S., Dwivedi, P. D., Khanna, S. K., Das, M. (2004). Detection of Aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. *Food Control*, **15**: 287-290.
17. Samarajeewa, U., Sen, A. C., Cohen, M. D., Wei, C. I. (1990). Detoxification of Aflatoxins in Foods and Feeds by Physical and Chemical Methods. *Journal of Food Protection*, **53**: 489-501.
18. Siahi Shadbad, M. R., Ansarin, M., Tahavori, A., Ghaderi, F., Nemati, M. (2012). Determination of aflatoxins in nuts of Tabriz confectionaries by ELISA and HPLC methods. *Adv Pharm Bull*, **2**: 123-126.
19. Van der Fels-Klerx, H. J., Vermeulen, L. C., Gavai, A. K., Liu, C. (2019). Climate change impacts on aflatoxin B1 in maize and aflatoxin M1 in milk: A case study of maize grown in Eastern Europe and imported to the Netherlands. *PloS one*, **14**: e0218956-e0218956.
20. Van Egmond, H. P. (1983). Mycotoxins in dairy products. *Food Chemistry*, **11**: 289-307.
21. Van Egmond, H. P. (1993). Rationale for regulatory programmes for mycotoxins in human foods and animal feeds. *Food Additives & Contaminants*, **10**: 29-36.
22. Yunus, A. W., Imtiaz, N., Khan, H., Ibrahim, M. N. M., Zafar, Y. (2019). Aflatoxin Contamination of Milk Marketed in Pakistan: A Longitudinal Study. *Toxins (Basel)*, **11**: 110.

contaminated. Int J Food Microbiol, **64**: 211-215.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 17, Issue 2,
Autumn & Winter 2021

Evaluation of aflatoxin B1 levels in TMR and aflatoxin M1 levels in raw milk by ELISA and HPLC

Shahin Eshghi[1], Jamileh Salar-Amoli[*2], Kamran Mirzaei[3]
1.Ph.D. graduated of Toxicology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran
2.Profesor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran
3.Ph.D. graduated of Epidemiology, Veterinary Organization, Tehran, Iran
Received: 7August 2021 Accepted: 19 April 2022

Abstract
Aspergillus flavus, A. parasiticus and A. nomius are the most important aflatoxin-producing species of B1, B2, G1 and G2 in food and feed. M1 and M2 Aflatoxins are the hydroxylated metabolites of B1 and B2 aflatoxins. The aim of this study was to evaluated the amount of aflatoxin B1 in animal feed and its relationship with aflatoxin M1 in raw milk.
For this purpose, 20 industrial and 20 semi-industrial farms were selected and a sample of TMR ration and raw milk of each farm was sampled separately.
Aflatoxin B1 in feed and Aflatoxin M1 in milk were evaluated by competitive ELISA, and the samples with values above maximum residue limit (MRL) were evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC). The ELISA results showed that 35% of industrial farm feed and 75% of semi-industrial farm feed were contaminated with aflatoxin B1, of which 5% and 15% of industrial and semi-industrial farm had values above MRL, respectively. Also, in evaluating the amount of aflatoxin M1 in produced milk, it was found that aflatoxin M1 was observed only in the milk of farms that were positive for aflatoxin B1 and this rate was 20% and 55% in industrial and semi-industrial farms, respectively.
The samples of milk with values above MRL were measured by HPLC confirmation test, which indicates that none of the samples of industrial and semi-industrial dairy production milk had higher values (0.5 ng/ml). Due to the importance of per capita milk consumption in the community diet and the dangers of aflatoxin M1 in it, extensive and accurate monitoring of milk production and supply centers as well as dairy factories is essential.

Keywords: Aflatoxin, Milk, TMR, ELISA, HPLC

**Corresponding author: Jamileh Salar-Amoli*
Department of Basic Sciences
Address: Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran
E. mail: jsalar@ut.ac.ir