«مقاله پژوهشی»

بررسی فراوانی آفلاتوکسینM1 به دو روش الایزا و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در شیر خام و پاستوریزه در شهرستان‌های شمال استان کرمان

سمیه صادقی[۱]، حمیدرضا قیصری[۲]، سارا بصیری[۳]، حسین رشیدی[٤]، سید شهرام شکرفروش[۵*]

۱. دانش‌آموخته دکترای بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۲. دانشیار بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۳. استادیار بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
٤. کارشناس ارشد اداره کل دامپزشکی استان کرمان، ایران
۵. استاد بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: shekar@shirazu.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۷/۸/۱٦ پذیرش نهایی: ۹۸/۱/۱۹)

چکیده

آفلاتوکسینM1، در شیر دام‌های تغذیه شده با علوفه آلوده وجود دارد. در مطالعه حاضر ۲۰۷ نمونه شامل ۱۵۳ نمونه شیر خام از گاوداری‌های صنعتی دوازده منطقه مختلف استان کرمان و ٥٤ نمونه شیر پاستوریزه تولیدی ده کارخانه فرآوری شیر استان کرمان جمع‌آوری شد و فراوانی آفلاتوکسین M1 در آن‌ها با روش الایزا موردسنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که غلظت آفلاتوکسین M1 در ٤١/٢ درصد از شیرهای خام و ۳۵/۲ درصد از شیرهای پاستوریزه بیش از محدوده مجاز استاندارد ملی ایران (۱۰۰ng/L) بود. میزان آفلاتوکسین M1 در شیر پاستوریزه به‌طور معنی‌داری از شیر خام کمتر بود. به‌منظور تأیید داده‌های الایزا، ٢٤ نمونه (۱۵/۷ درصد) از شیرهای خام و ۲ نمونه (۳/۷ درصد) از شیرهای پاستوریزه با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد ارزیابی قرار گرفتند که از این میان، ٤ نمونه از نمونه-های مثبت و ۵ نمونه منفی، با HPLC تأیید شدند. مقادیر اندازه‌گیری شده آفلاتوکسین M1 با دو روش الایزا و HPLC همبستگی معنی‌دار داشت. حساسیت و ویژگی آزمون الایزا به‌ترتیب ۱۰۰ درصد و ۲۵ درصد تعیین گردید. ازآنجاکه سطح آفلاتوکسین شیر در منطقه بالاتر از محدوده مجاز بود، نیاز به اصلاحات اساسی در مدیریت تغذیه گاوداری‌های منطقه ضروری به نظر می‌رسد. باوجود این‌که الایزا روشی مناسب در غربالگری آفلاتوکسین است ولی استفاده از روش‌هایی که افزون بر حساسیت بالا، از ویژگی بهتری نیز برخوردار باشند، در تشخیص فراوانی آفلاتوکسین توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین M1، الایزا، HPLC، شیر

مقدمه

آفلاتوکسین‌ها ترکیباتی سمی و موتاژن هستند که توسط گونه‌های *Aspergillus flavus*، *A. parasiticus* و *A. nomius* تولید می‌شوند (Asi *etal*., 2012). مسمومیت حاد و مزمن با این ترکیبات برای انسان و دام خطرآفرین بوده و عوارضی چون آسیب کبدی، سیروز کبدی و تومور را باعث می‌شوند (Deshpande *et al*., 2002).

شیر و فرآورده‌های آن منبع بسیار خوبی از مواد مغذی ازجمله پروتئین و کلسیم هستند، بااین‌وجود این محصولات مهم‌ترین منبع آفلاتوکسین M1 برای انسان محسوب می‌شوند (Pei *et al*., 2009). آفلاتوکسین M1 متابولیت هیدروکسیله شده آفلاتوکسین B1 می‌باشد که در شیر پستاندارانی که خوراک آلوده مصرف کرده‌اند یافت می‌شود (Ruangwises and Ruangwises, 2010). مقادیر اندک آفلاتوکسین M1 می‌تواند مخاطرات و عوارض جدی برای انسان ایجاد کند. در اطفال این عوارض از اهمیت بیشتری برخورداراست (Rastogi *et al*., 2004). بر این اساس، کشورهای مختلف استانداردهای متفاوتی برای حداکثر مجاز آفلاتوکسین M1 تعیین کرده‌اند (Chen and Gao,1993). حداکثر مقدار مجاز آفلاتوکسین M1 در شیر در اتحادیه اروپا، ایران و امریکا به‌ترتیب ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ نانوگرم در لیتر تعیین شده است (ISIRI, 2016; Stoloff *et al*.,1991). روش‌های متعددی برای اندازه-گیری آفلاتوکسین در فرآورده‌های غذایی شناسایی شده است. روش‌های الایزا (Pei *et al*., 2009)، کروماتوگرافی لایه‌نازک (Var *et al*., 2007)، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (Manetta *et al*., 2005; Calleri *et al*., 2007) و اسپکتروسکوپی مادون‌قرمز (Hernández-Hierro *et al*., 2008) برخی از روش‌های تأیید شده در تشخیص این سم قارچی هستند. به علت اهمیت این سم در سلامت انسان و سهم مهم شیر در تأمین نیازهای تغذیه‌ای، هدف از مطالعه حاضر بررسی غلظت آفلاتوکسین M1 در نمونه‌های شیر تانک مخزن گاوداری‌ها و شیر پاستوریزه کارخانه‌های موجود در شهرستان‌های شمالی استان کرمان و مقایسه دو روش الایزا و HPLC در تشخیص غلظت آفلاتوکسین M1 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۲۰۷ نمونه شیر شامل ۱۵۳ نمونه شیر خام مخزن همه گاوداری‌های شهرستان‌های شمالی استان کرمان شامل شهربابک، رفسنجان، بم، سیرجان، زرند، بردسیر، راور، کرمان، انار، بافت، ارزوییه و رابر و ٥٤ نمونه شیر پاستوریزه تولیدی کارخانه‌های شیر موجود در شهرستان‌های شمالی استان کرمان در فصل زمستان سال ۱۳۹٦ جمع‌آوری و با حفظ زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل گردید و ازنظر آفلاتوکسین M1 مورد ارزیابی قرار گرفت.

- اندازه‌گیری آفلاتوکسین M1 با روش الایزا

نمونه‌های شیر خام در دمای ۳ ± ۵ درجه سلسیوس و دور g ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. چربی شیر (لایه فوقانی) دور ریخته شد و مایع زیرین تا

زمان آزمایش در دمای۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. روند انجام آزمایش، بر اساس روش تعیین شده توسط شرکت سازنده کیت الایزا (Tecna, Italy) انجام شد و جذب نمونه در طول‌موج ٤٥٠ نانومتر توسط قرائت‌گر الایزا (Biotek, USA) خوانده شد و پس از رسم منحنی استاندارد، غلظت آفلاتوکسین M1 نمونه‌ها برحسب نانوگرم در لیتر محاسبه گردید.

- اندازه‌گیری آفلاتوکسین M1 با روش HPLC

- استخراج آفلاتوکسین M1

استخراج آفلاتوکسین M1 از شیر توسط روش Asi *et al.*, 2012، با کمی تغییرات انجام شد. دمای نمونه-های شیر که قبلاً با سانتریفیوژ شدن، چربی آن‌ها جدا شده بود را با قرار دادن در حمام آب به ۳۷ درجه سلسیوس رسانده و با کاغذ فیلتر واتمن شماره ۵ فیلتر شد. ۵۰ میلی‌لیتر از نمونه فیلتر شد از ستون ایمینوافینیتی AflaM™ (Vicam, USA) با سرعت ۲ میلی‌لیتر در دقیقه عبور داده شد. برای حذف ناخالصی‌ها، ستون با ۲۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر شستشو شد. آفلاتوکسین M1 اتصال یافته به آنتی‌بادی، با استونیتریل خالص (٤ میلی‌لیتر) و به‌مدت حداکثر ٦٠ ثانیه شسته شد. سرانجام محلول به‌دست آمده از شستشو با استفاده از جریان ملایم نیتروژن در ٤٠ درجه سلسیوس تبخیر شد و سپس باقی‌مانده‌ها در ۱ میلی‌لیتر فاز متحرک (استونیتریل: آب با نسبت ۱:۳) حل شدند.

- تزریق به دستگاه HPLC

۲۰۰ میکرولیتر از نمونه استخراج شده در بالا به دستگاه HPLC (Shimazdzu LC-10A, Japan) دارای ستون C18 (۲۵۰mm× ٤/٦، ٥ µm) و شناساگر فلورسانت تزریق شد. از استونیتریل (Sigma, USA) و آب دوبار تقطیر (۲۵: ۷۵ حجمی/حجمی) به‌عنوان فاز متحرک استفاده شد. سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی‌متر در دقیقه بود. از رقت‌های مختلف آفلاتوکسین M1 (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ میکرولیتر در لیتر) در استونیتریل به‌منظور رسم منحنی استاندارد استفاده شد (Asi *et al.*, 2012).

- تجزیه و تحلیل آماری

کلیه ارزیابی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد. داده‌ها در مرحله اول به‌صورت توصیفی تحلیل شدند. مقایسه میانگین آفلاتوکسین شیر خام با پاستوریزه با روش آماری تست تی انجام شد. به‌منظور بررسی همبستگی بین داده‌های کمی و کیفی از روش همبستگی پیرسون و اسپیرمن استفاده شد. مقایسه بین تعداد موارد مثبت و منفی دو آزمون الایزا و HPLC، با استفاده از آزمون مک‌نمار انجام شد. *p*value کم‌تر از ۰/۰۵ به لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ارزیابی مقایسه‌ای ۱۵۳ دامداری مختلف در شهرستان کرمان نشان داد که فراوانی آفلاتوکسین M1 در دامداری‌ها متفاوت است. ۹۰/۲ درصد از دامداری‌های مورد بررسی، دارای گاو هولشتاین بودند. ٦/٥ درصد از دامداری‌ها دارای دو نژاد هولشتاین و جرسی و ۳/۳ درصد دارای گاو نژاد بومی بودند.

- اندازه‌گیری آفلاتوکسین M1 به روش الایزا

از ۱۵۳ نمونه اخذ شده از دامداری‌های مناطق مختلف استان، غلظت آفلاتوکسین M1 در٦٣ نمونه شیر خام (٤١/٢ درصد)، از محدوده مجاز استاندارد ایران (۱۰۰ نانوگرم در لیتر) بالاتر و در۹۰ نمونه (۵۸/۸ درصد) این

میزان در محدوده مجاز بود. از میان نمونه‌های ارزیابی شده تنها ۷ نمونه (٤/٥٨ درصد) دارای غلظت آفلاتوکسین M1 بالاتر از محدوده مجاز ایالات‌متحده (٥٠٠ نانوگرم در کیلوگرم) بودند. شهرستان زرند دارای بیش‌ترین غلظت (٦٣٣/٩٨ ± ٣٥٧/٢٨ نانوگرم در لیتر) و ارزوییه (٧٦/٢٦ ± ٤٥/٦٢ نانوگرم در لیتر) دارای کم‌ترین غلظت آفلاتوکسین M1 در شیر خام بود. تعداد موارد مثبت و منفی الایزا در شیر خام و پاستوریزه به تفکیک مناطق مختلف جغرافیایی در جدول (١) و (٢) آورده شده است.

جدول (١)– فراوانی تعداد نمونه‌های منفی، مثبت و نمونه‌های با آلودگی بیش‌ازحد مجاز استاندارد ملی ایران به آفلاتوکسین M1 (١٠٠ نانوگرم در لیتر) شیر خام گاوداری‌های مناطق مختلف جغرافیایی استان کرمان به روش الایزا

منطقه جغرافیایی	تعداد نمونه	تعداد و (٪) نمونه‌های منفی	تعداد و (٪) نمونه‌های مثبت	تعداد و (٪) نمونه‌های با آلودگی بیش‌ازحد مجاز
شهربابک	١٤	٢ (١٤/٣)	١٢ (٨٥/٧)	٩ (٦٤/٣)
رفسنجان	١٥	٠ (٠/٠)	١٥(١٠٠)	١٠ (٦٦/٧)
بم	١٠	٤ (٤٠/٠)	٦ (٦٠/٠)	٤ (٤٠/٠)
سیرجان	٢١	٨ (٣٨/١)	١٣ (٦١/٩)	٤ (١٩/٠)
زرند	٧	١ (١٤/٣)	٦ (٨٥/٧)	٥ (٧١/٤)
بردسیر	٢٢	٧ (٣١/٨)	١٥ (٦٨/٢)	٦ (٢٧/٣)
راور	٧	٣ (٤٢/٩)	٤ (٥٧/١)	٤ (٥٧/١)
کرمان	٣٩	١٠ (٢٥/٦)	٢٩ (٧٤/٤)	١٣ (٣٣/٣)
انار	٤	١ (٢٥/٠)	٣ (٧٥/٠)	٢ (٥٠/٠)
بافت	٦	١ (١٦/٧)	٥ (٨٣/٣)	٢ (٣٣/٣)
ارزوییه	٥	٣ (٦٠/٠)	٢ (٤٠/٠)	١ (٢٠/٠)
رابر	٣	٠ (٠/٠)	٣ (١٠٠)	٣ (١٠٠)
مجموع	١٥٣	٤٠ (٢٦/١)	١١٣ (٧٣/٩)	٦٣ (٤١/٢)

جدول (۲)- فراوانی تعداد نمونه‌های منفی، مثبت و نمونه‌های با آلودگی بیش‌ازحد مجاز استاندارد ملی ایران به آفلاتوکسین M1 (۱۰۰ نانوگرم در لیتر) شیرهای پاستوریزه تولیدی کارخانه‌های مختلف استان کرمان به‌روش الایزا

کد کارخانه شیر	تعداد نمونه	تعداد و (٪) نمونه‌های منفی	تعداد و (٪) نمونه‌های مثبت	تعداد و (٪) نمونه‌های با آلودگی بیش‌ازحد مجاز
۱	۵	۱ (۲۰/۰)	٤ (۸۰/۰)	۲ (٤۰/۰)
۲	٤	۰ (۰/۰)	٤ (۱۰۰)	۱ (۲۵/۰)
۳	۷	۲ (۲۹/٦)	۵ (۷۱/٤)	٤ (۵۷/۱)
٤	۷	۲ (۲۹/٦)	۵ (۷۱/٤)	۲ (۲۸/٦)
۵	۹	۰ (۰/۰)	۹ (۱۰۰)	۷ (۷۷/۸)
٦	٤	۱ (۲۵/۰)	۳ (۷۵/۰)	۳ (۷۵/۰)
۷	٤	٤ (۱۰۰/۰)	۰(۰/۰)	۰ (۰/۰)
۸	٦	۵ (۸۳/۳)	۱ (۱٦/۷)	۰ (۰/۰)
۹	٤	۲ (۵۰/۰)	۲ (۵۰/۰)	۰ (۰/۰)
۱۰	٤	۰ (۰/۰)	٤ (۱۰۰)	۰ (۰/۰)
مجموع	۵٤	۱۷ (۳۱/۵)	۳۷ (٦۸/۵)	۱۹ (۳۵/۲)

غلظت آفلاتوکسین M1 در شیرهای خام و پاستوریزه در جدول (۳) آورده شده است. همان‌طور که در جدول (۳) مشخص شده است، میزان آفلاتوکسین M1 در شیر پاستوریزه به‌طور معنی‌داری از شیر خام کم‌تر بود (P=۰/۰۱۲) است. غلظت آفلاتوکسین M1 در ۱۹ نمونه (۳۵/۲ درصد) از محدوده مجاز استاندارد ایران بالاتر بود و ۳۵ نمونه (٦٤/۸ درصد) از نمونه‌ها در محدوده مجاز قرار داشتند. بااین‌وجود کلیه نمونه‌های شیر پاستوریزه دارای مقادیر آفلاتوکسین M1 کمتر از محدوده مجاز ایلات متحده امریکا (کمتر از ۵۰۰ نانوگرم در لیتر) بودند.

میزان آفلاتوکسین M1 شیر دامداری‌ها، با کاهش شرایط بهداشتی در دامداری به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (r= -۰/۱۹۵، P=۰/۰۱۸).

جدول (۳)- توزیع فراوانی مقدار آفلاتوکسین M1 در شیر خام مخزن گاوداری‌های استان کرمان و شیر پاستوریزه تولیدی کارخانه‌های این استان به روش الایزا

نوع شیر	مقدار و (٪) آفلاتوکسین M1 (نانوگرم در لیتر)					
	≤ ۱۰۰	۱۰۱-۵۰۰	۵۰۱-۱۰۰۰	۱۰۰۱-۱۵۰۰	۱۵۰۱-۲۰۰۰	≥۲۰۰۱
خام	۹۰ (۵۸/۸)	۵٦ (۳٦/٦)	۲ (۱/۳)	۰ (۰)	۱ (۰/۷)	٤ (۲/٦)
پاستوریزه	۳۵ (٦٤/۸)	۱۹ (۳۵/۲)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)

- اندازه‌گیری آفلاتوکسین M1 به‌روش HPLC

۲٤ نمونه (۱۵/۷ درصد) از شیرهای خام و ۲ نمونه (۳/۷ درصد) از شیرهای پاستوریزه مورد ارزیابی تأییدی با HPLC قرار گرفت که تعداد موارد مثبت و منفی هر دو آزمون و میزان تطبیق داده‌ها با یکدیگر در جدول (٤) آورده شده است.

جدول (٤)- فراوانی موارد مثبت و منفی آفلاتوکسین M1 در شیر خام با دو آزمون الایزا و HPLC

		HPLC		مجموع
		مثبت	منفی	
الایزا	مثبت	٤	۱۵	۱۹
	منفی	۰	۵	۵
	مجموع	٤	۲۰	۲٤
sig		۰/۰۰		

آزمون الایزا ۱۹ نمونه را مثبت تشخیص داد که از این میان ٤ نمونه توسط HPLC تائید گردید و ۱۵ نمونه دیگر منفی اعلام شدند. ۵ نمونه که توسط روش الایزا منفی تعیین شده بود با روش HPLC مورد تائید قرار گرفت. حساسیت آزمون الایزا در این مطالعه ۱۰۰ درصد و ویژگی آن ۲۵ درصد تعیین گردید. بین مقدار آفلاتوکسین قرائت شده در روش الایزا و HPLC همبستگی قوی و معنی‌دار مشاهده شد (r=۰/۷۵٦، P=۰/۰۰۰). بر این اساس استفاده از روش الایزا به‌عنوان روش غربالگری در تشخیص موارد مثبت آفلاتوکسین M1 مناسب است ولی احتمال مثبت کاذب در آن بسیار زیاد است.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر تعداد موارد مثبت و غلظت آفلاتوکسین M1 در مناطق مختلف جغرافیایی استان کرمان، متفاوت بود. منبع تأمین خوراک دام، فاکتورهای اقتصادی، مدیریت مزرعه و متغیرهای جغرافیایی مانند درجه حرارت و رطوبت نسبی، در میزان آفلاتوکسین M1 موجود در شیر تأثیرگذار است (Kuiper-Goodman, 1999). در مطالعه حاضر میزان آفلاتوکسین M1 در دامداری‌هایی که دارای شیر برگشتی بودند، به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (r =۰/۱۸، P =۰/۰۲۸).

غلظت آفلاتوکسین M1 صد در صد نمونه شیرهای پاستوریزه و استریلیزه مصرفی در بابل بیش از محدوده مجاز کمیته اروپایی و کدکس گزارش شد

(Gholampour Azizi *et al*., 2007). در مطالعه‌ای صد درصد نمونه‌های شیر خام در ارومیه حاوی مقادیر آفلاتوکسین M1 بالاتر از استاندارد اروپا بودند (Panahi *et al*., 2011)، درحالی‌که میزان آفلاتوکسین M1 شیر خام مراکز جمع‌آوری شیر چالوس و رامسر به‌ترتیب ٤٥ و ۳۰ درصد گزارش شد (Barami *et al*., 2011).

۸۹/۱۹ درصد از شیرهای خام و پاستوریزه جمع‌آوری‌شده در شهر اصفهان، دارای آفلاتوکسین M1 بودند که از این میان، افلاتوکسین ۱۰/۸۱ درصد از نمونه‌ها بالاتر از حد مجاز بود (Daraei Garmakhany *et al*., 2011). ده درصد از شیرهای خام و ۲/۱ درصد از شیرهای پاستوریزه شهرستان رفسنجان، دارای مقادیر آفلاتوکسین M1 بیش‌ازحد استاندارد هستند (Akrami Mohajeri *et al*., 2015). میزان آلودگی به آفلاتوکسین M1، در شیرهای خام و پاستوریزه شهر ایلام در فصل زمستان، به‌ترتیب ٦٦/٦ و ٤٢/٨ درصد گزارش شد (Vagef, and Mahmoudi, 2013). میزان آفلاتوکسین M1 ٥/٤ درصد از شیرهای پاستوریزه در مشهد از محدوده استاندارد اروپا بالاتر بود (Karimi *et al*., 2007). در مطالعه حاضر ٤١/٢ درصد از شیرهای خام و ۳۵/۲ درصد از شیرهای پاستوریزه حاوی آفلاتوکسین M1 در غلظت بالاتر از محدوده مجاز استاندارد ایران بودند. تفاوت در زمان نمونه‌برداری، روش تشخیص آفلاتوکسین M1 و شرایط بهداشتی، از مهم‌ترین عوامل متفاوت بودن نتایج بررسی‌های مختلف است (Karimi *et al*., 2007).

در کشور کره، فراوانی آفلاتوکسین M1 در شیر پاستوریزه، شیر خشک اطفال، شیر خشک و ماست به‌ترتیب ٧٦، ٨٥، ٧٥ و ٨٣ درصد گزارش گردید (Kim *et al*., 2000). محققین همبستگی بالایی (r^2=۰/۹۸) بین دو روش الایزا و HPLC در تشخیص آفلاتوکسین M1 یافتند ولی بیان کردند که دامنه تشخیص روش الایزا در مقایسه با روش HPLC کمتر است. بااین‌حال، آن‌ها روش الایزا را به‌عنوان روشی متداول برای ارزیابی آفلاتوکسین M1 در شیر و فرآورده‌های آن معرفی نمودند. محققین در هند نیز فراوانی آفلاتوکسین M1 در شیر گاومیش، گاو، بز و گوسفند را با روش الایزا ٤٥-۳۳ درصد گزارش نمودند. این محققین بیان کردند که میزان آفلاتوکسین M1 شیر در مناطق شهری از مناطق روستایی بیشتر است (Nile *et al*., 2015).

در مطالعه حاضر، غلظت آفلاتوکسین M1 در شیر پاستوریزه به‌طور معنی‌داری از شیر خام کمتر بود. البته بین تعداد موارد مثبت در شیرهای خام و پاستوریزه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. به‌طور کلی، در کارخانه‌های شیر پاستوریزه به‌دلیل مخلوط شدن شیر دریافتی از مراکز مختلف، معمولاً غلظت آلاینده‌های مختلف ازجمله آفلاتوکسین کاهش می‌یابد. کم‌تر بودن آفلاتوکسین M1 در شیرهای پاستوریزه در مقایسه با شیر خام، در شهر ایلام (Vagef, and Mahmoudi, 2013)، رفسنجان (Akrami Mohajeri, *et al*., 2015) و ارومیه (Tajic *et al*., 2007) نیز گزارش شده است. در ارتباط با تأثیر حرارت بر آفلاتوکسین M1، نظرات متناقضی وجود دارد. در مطالعه‌ای بیان شد که غلظت آفلاتوکسین M1 شیر پس از پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون به‌ترتیب ٦٣ درصد و ٨٠ درصد کاهش می‌یابد (Purchase *et al*., 1978). در مطالعه دیگر بیان شد که طی روند حرارتی، غلظت آفلاتوکسین M1 در پنیر کاهش می‌یابد (Deveci *et al*., 2007). میزان

تخریب آفلاتوکسین M1 بسته به دما و مدت‌زمان حرارت‌دهی متفاوت است (Choudhary *et al*., 1998). این در حالی است که برخی محققین بیان می‌کنند آفلاتوکسین M1، به تخریب حرارتی ناشی از پاستوریزاسیون، استریلیزاسیون و حرارت پخت مقاوم است (Hussain *et al*., 2008؛ Boudra *et al*., 2007). نتایج حاصل از این مطالعه وجود آفلاتوکسین M1 در شیرهای خام دامداری‌های استان کرمان در مقادیر بالاتر از محدوده مجاز ایران را مطرح می‌کند. از آن‌جا که مدیریت پرورش دام در غلظت آفلاتوکسین M1 شیر تأثیرگذار است، لزوم مدیریت مناسب و اصلاحات اساسی در خوراک مزارع پرورش دام از اهمیت بالایی برخوردار است. با توجه به همبستگی مشاهده شده بین نتایج به‌دست آمده از دو روش الایزا وHPLC، به‌نظر می‌آید هرچند که روش الایزا روشی مناسب در غربالگری اولیه است اما مطالعه، ابداع و بهره‌گیری از روش‌های سریع و ارزان دیگری که علاوه بر حساسیت بالا ویژگی بالا نیز داشته باشند ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مدیریت محترم اداره کل دامپزشکی استان کرمان به‌خاطر همکاری در تهیه نمونه‌های شیر گاوداری‌های استان کرمان و زحمات کارکنان محترم آزمایشگاه مرکزی اداره کل، خانم‌ها دکتر سارا حمزه، مهندس مژگان عبدالحسین‌زاده و مهندس پریسا خواجویی که در تمام مراحل انجام این تحقیق همکاری نمودند سپاسگزاری می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Akrami Mohajeri, F., Amiri, A., Khorramdel Azad, H., Ahmadi, Z., Asadollahi, Z., Rezaeian, M., Fallah, A.A., and Ghalebi. S.R. (2015). Occurrence of Aflatoxin M1 in Raw and Pasteurized Milk Produced in Rafsanjan, Iran. Journal of Community Health Research.;4(3): 215- 219.
- Asi, M.R., Iqbal, S.Z., Ariño, A. and Hussain, A. (2012). Effect of seasonal variations and lactationtimes on aflatoxin M1 contamination in milk of different species from Punjab, Pakistan. Food Control, 25(1): 34-38.
- Barami, A.R., Pour Elmi, M.R., Irani, M. (2011). Contamination levels of aflatoxin M1 in bulk raw milk of Chaloos and Ramsar. Food Hygiene, 4(4): 53- 60. [In Persian]
- Calleri, E., Marrubini, G., Brusotti, G., Massolini, G. and Caccialanza, G. (2007). Development and integration of an immunoaffinity monolithic disk for the onlinesolid-phase extraction and HPLC determination with fluorescence detection of aflatoxin B1 in aqueous solutions. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 44(2): 396–403.
- Chen, J., Gao, J. (1993). The Chinese total diet study in 1990. Part 1 Chemical contaminants. Journal of AOAC International, 76(6): 1193–1205.
- Choudhary, P.L., Sharma, R.S. and Borkartria, V.N. (1998). Effect of chilling and heating on aflatoxin M1 content of contaminated Indian cow’s milk. Egyptian Journal of DairyScience, 26: 223–229.
- Daraei garmkhany, A., Zighamian, H., Sarhangpour, R., Rasti, M., and Aghajnai, N. (2011). Occurrence of Aflatoxin Ml in Raw and pasteurized milk in Esfahan province of Iran. MINERVA B!OfEC, 23(2-3):53-7.

- Deshpande, S.S. (2002). Fungal toxins. In S. S. Deshpande (Ed.), Handbook of food toxicology New York: Marcel Decker. pp. 387–456.
- Deveci, O. (2007). Changes in the concentration of aflatoxin M1 during manufactureand storage of white pickled cheese. Food Control, 18(9): 1103–1107.
- Gholampour Azizi, I., Khoushnevis, S.H. and Hashemi, S.J. (2007). Aflatoxin M1 level in pasteurized and sterilized milk of Babol city. Tehran University Medical Journal, 65(1): 20-24. [In Persian]
- Hernández-Hierro, J.M., García-Villanova, R.J. and González-Martín, I. (2008). Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of mycotoxins applied tonaturally contaminated red paprika found in the Spanish market. Analytica Chimica Acta, 622(1–2): 189–194.
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI), (2016). Milk and milk products – Raw milk – Specification and test methods. Amendment No.1, ISIRI No. 5925. [In Persian]
- Karimi, G., Hassanzadeh, M., Teimuri, M., Nazari, F. and Nili, A. (2007). Aflatoxin M1 Contamination in Pasteurized Milk in Mashhad, Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences, 3(3): 153-156. [In Persian]
- Kim, E.K., Shon, D.H., Ryu, D., Park, J.W., Hwang, H.J. and Kim, Y.B. (2000). Occurrence of aflatoxin M1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. Food Additives and Contaminants, 17(1): 59 -64
- Kuiper-Goodman, T. (1999). Approaches to the risk analysis of mycotoxins in thefood supply. Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins. Tunis, Tunisia Myc – Conf/99/7a, 4–6 ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/myco7a.
- Manetta, A. C., Di Giuseppe, L., Giammarco, M., Fusaro, I., Simonella, A., Gramenzi, A., *et al*. (2005). High-performance liquid chromatography with post-column derivatisation and fluorescence detection for sensitive determination of aflatoxin M1 in milk and cheese. Journal of Chromatography A, 1083(1–2): 219–222.
- Nile, S.H., Se Won Park, S.W. and Khobragade, C.N. (2015). Occurrence and analysis of aflatoxin M1 in milk produced by Indian dairy species. Food and Agricultural Immunology. 27(3): 355-368 DOI: 10.1080/09540105.2015.1104655.
- Panahi, P., Kasaee, S., Mokhtari, A., Sharifi, A., and Jangjou, A. (2011). Assessment of Aflatoxin M1 Contamination in Raw Milk by ELISA in Urmia, Iran. American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences 3 (4): 231-233.
- Pei, S.C., Zhang, Y.Y., Eremin, S.A. and Lee, W.J. (2009). Detection of aflatoxin M1 in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. Food Control, 20(12): 1080–1085.
- Purchase, I., Steyn, M., Rinsma, R. and Tustin, R. (1978). Reduction of the aflatoxin M1 content of milk of processing. Food and Cosmetics Toxicology, 10(3): 383-387.
- Rastogi, S., Dwivedi, P. D., Khanna, S. K. and Das, M. (2004). Detection of aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. Food Control. 15(4): 287–290.
- Ruangwises, N. and Ruangwises, S. (2010). Aflatoxin M1 contamination in raw milk within the central region of Thailand. Bull Environ Contam Toxicol. 85(2): 195–198.
- Stoloff, L., Van agmond, H.P. and Parks, D.L. (1991). Rationales for the establishment of limits and regulations for mycotoxins. Food Additives and Contaminants, 8(2): 222–231.
- Tajic, H., Razavi Rohani, S.M., and Moradi, M. (2007). Detection of aflatoxin M1 in raw and commercial pasteurized milk in Urmia, Iran. PAKISTAN Journal of Biological Sciences 10(22): 4103- 4107.
- Vagef, R., and Mahmoudi, R. (2013). Occurrence of Aflatoxin M1 in raw and pasteurized milk produced in west region of Iran (during summer and winter). International Food Research Journal 20(3): 1421-1425.

• Var, I., Kabak, B. and Gok, F. (2007). Survey of aflatoxin B1 in helva, a traditional Turkish food, by TLC. Food Control, 18(1): 59–62.

"Research article"

The frequency of aflatoxin M1 detected by ELISA and high performance liquid chromatography in raw and pasteurized milk in the northern province of Kerman

Sadeghi, S.[1], Gheisary, H.R.[2], Basiri, S.[3], Rashidi H. [4], Shekarforoush, S.S.[5*]

1. phD Graduate of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
2. Associate Proffesor of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
3. Assistant Professor of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
4. Senior Expert of Veterinary Department of Kerman province, Iran
5. Professor of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

*Corresponding Author:shekar@shirazu.ac.ir

(Received: 2018/11/7 Accepted: 2019/4/8)

Abstract

The aflatoxin M1 (AFM1) is present in the milk of livestock fed on contaminated feed. This study was conducted based on the fact that milk is one of the main sources of aflatoxin contamination in human. In order to record the frequency of AFM1, a total of 207 milk samples including 153 raw milk samples from 12 different regions of Kerman province and 54 pasteurized milk samples produced in 10 dairy factories of Kerman province were checked by Elisa. Results showed that the concentration of AFM1 in 41.2% of raw and 35.2% of the pasteurized samples was above the maximum acceptable level (100 ng/L) approved by National Institute of Standard, Iran. The amount of AFM1 in pasteurized milk was significantly lower than that in the raw milk. In order to confirm the results of ELISA, 24 samples of raw milk and 2 samples of pasteurized milk were also evaluated by HPLC, from which, four positive and five negative samples were finally confirmed. Although there was no significant correlation between the number of positive and negative samples in both methods, the concentration of AFM1 was significantly correlated. The sensitivity and the specificity of the ELISA test was respectively 100% and 25%. Since the concentration of aflatoxin was higher than the accepted level, a proper strategy of feeding management of the dairy farms in the province are suggested. In spite of the fact that ELISA is a suitable method for screening of AFM1, using a method with higher specificity is also recommended.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Aflatoxin M1, Elisa, HPLC, Milk