● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره نهم، شمارهٔ ۵، آذر – دی ۱۳۸٦، صفحه ۲۷-۳۱
دریافت: ۸۵/۱۲/۷، ارسال جهت اصلاح: ۸٦/۲/۲٦، پذیرش: ۸٦/۸/۲

مقایسه میزان آفلاتوکسین M_1 در شیر پاستوریزه مصرفی شهر بابل در فصول زمستان و تابستان

سیدعلی اصغر سفیدگر [*۱]، عیسی غلامپور عزیزی[۲]، معصومه میرزائی[۳]، شمسعلی هادی زاده معلم[۴]، معصومه آزرمی[۴]

۱- استادیار گروه قارچ و انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- استادیار گروه دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل
۳- متخصص قارچ شناسی پزشکی ۴- مربی بخش قارچ شناسی و انگل شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل

سابقه و هدف: مایکوتوکسین ها سموم قارچی هستند که مهمترین آنها آفلاتوکسین ها می باشند. در پی مصرف آفلاتوکسین B_1 توسط دام های شیری، آفلاتوکسین M_1 (AFM_1) از راه شیر و لبنیات به انسان منتقل می شوند و به دلیل ایجاد سرطان کبد، فعالیت سرکوب ایمنی و کاهش رشد، به شدت برای سلامتی انسان مخاطره انگیز می باشند. هدف از این مطالعه سنجش آفلاتوکسین M_1 در شیر پاستوریزه مصرفی شهر بابل می باشد.

مواد و روشها: مطالعه به صورت مقطعی بر روی ۱٤٤ نمونه شیرپاستوریزه در طی زمستان ۱۳۸٤ و تابستان ۱۳۸۵ که از سوپرمارکت های شهر بابل جمع آوری شده بود انجام شد. نمونه های شیر پس از سانتریفوژ، چربی روی آن برداشته شد و مایع زیرین آن (Skimmed milk) به روش الایزا رقابتی از نظر آفلاتوکسین M1 مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها: میزان آلودگی شیر پاستوریزه از نظر آفلاتوکسین M1 در ماه های دی، بهمن، اسفند، تیر، مرداد و شهریور صد درصد بود. میانگین آن به ترتیب ۲۲۷/۸۵، ۲۲۹/٦٤، ۲۳۳/۱، ۱۱۰/٤، ۱۲۰/۱۷ و ۱۱۲/٤۸ نانوگرم در لیتر(ng/l) گزارش گردید. در فصل زمستان ۹۱/۵٪ نمونه ها بیش از ۲۰۰ نانوگرم در لیتر آلودگی داشتند، در صورتی که آلودگی در فصل تابستان در صد درصد نمونه ها بین ۱۵۰-۱۰۱ نانوگرم در لیتر بود. به طور کلی میزان آلودگی آفلاتوکسین M_1 در زمستان بین ۱۰۳/۳ ng/l تا ۱۳۲/۷ ng/lو میانگین آن ۱۱٤/۳۵ ng/l بود، در صورتی که در تابستان بین ۱۷۸/۸ ng/l تا ۲۵۳/۵ ng/l و میانگین آن ۲۳۰/۲ ng/l بود.

بحث و نتیجه گیری: در این بررسی میزان آلودگی آفلاتوکسین M_1 در شیر پاستوریزه ۱۰۰٪ و بیش از حد مجاز کمیته اروپایی و غذایی (۱۵۰mg) بود. لذا با توجه به اینکه آفلاتوکسین M1 یک مشکل جدی برای بهداشت عمومی و سلامتی انسان است، برای به حداقل رساندن این میزان در شیر باید جیره غذایی دام تازه بوده و به طور مرتب از نظر آفلاتوکسین مورد ارزیابی قرار گیرند.

واژه های کلیدی: *آفلاتوکسین M_1 ، شیر پاستوریزه، الایزا.*

مقدمه

آفلاتوکسین ها از لحاظ ساختمانی در یک گروه ترکیبات سمی قرار دارند که در اکثر محصولات گیاهی نظیر بادام زمینی، مغز نارگیل، سویا، ذرت، برنج، پنبه دانه و گندم یافت می شوند و عمدتا بوسیله سوش های ویژه ای از آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس تولید می شوند. این قارچها توکسین زا بوده و محصولات غذائی را در مراحل مختلف تهیه و تولید به ویژه در شرایط رطوبتی و حرارتی مناسب آلوده می کنند. آفلاتوکسین ها دارای انواع مختلفی چون B_1, B_2 G_1, G_2 می باشند. آسپرژیلوس فلاووس فقط آفلاتوکسین های B تولید می کند در حالیکه گونه های دیگر هم آفلاتوکسین B و هم G تولید می کنند (۱). این توکسین ها در غذاهای متعدد انسانی و حیوانی یافت می شوند. آفلاتوکسیکوز در کشورهای صنعتی و پیشرفته رخ می دهد و ضمن

▣ هزینه انجام این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۱٦٦۲۱٤٤٤۲٦ از اعتبارات دانشگاه علوم پزشکی بابل تامین شده است.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1386.9.5.4.3]

وابسته بودن به شرایط محیطی، اجتماعی و اقتصادی، به شرایط اقلیمی چون رطوبت و حرارت که برای رشد قارچ مناسب می باشند، نیز بستگی دارد (۲). AFM_1 و AFM_2 متابولیت اکسیداتیو AFB_1 و AFB_2 است که بوسیله اعمال آنزیمهای میکروزومال کبدی ایجاد می شود و معمولا از راه شیر، ادرار و مدفوع دام ها و بعضی از گونه های پستاندارانی که جیره غذائی آلوده به آفلاتوکسین مصرف می کنند، ترشح می شوند (۲و۳). آفلاتوکسین M_1 به بخش پروتئینی شیر یعنی کازئین باند می شوند (۴). آفلاتوکسین ترکیباتی با سمیت حاد، ایمونوسوپرسیو، موتاژنیک، تراتوژنیک و کارسینوژنیک می باشند (۵). آژانس پژوهشی بین المللی سرطان WHO آفلاتوکسین B_1 و M_1 را به ترتیب گروه اولیه و ثانویه ترکیبات سرطان زا معرفی نمود (۶). ارگان هدف اصلی برای سمیت (Toxicity) و سرطانزائی (Carcinogenicity) آن کبد است. گرچه آفلاتوکسین M_1 میزان موتاژنیک و کاسینوژنیک کمتری نسبت به آفلاتوکسین B_1 دارد ولی دارای فعالیت سمیت ژنی (Genotoxic Activity) بالاتری است (۷). آفلاتوکسین M_1 به حرارت پاستوریزاسیون، اتوکلاو و دیگر روشهای مراحل غذائی مقاومت نشان می دهد و در کاهش آن بی تاثیر می باشد (۸و۹). حد استاندارد غذائی در هر کشور ممکن است متفاوت با سایر کشورها باشد (۱۰). کمیته اروپائی و غذائی کودکس، ماکزیمم میزان آفلاتوکسین M_1 را در شیر خام، مایع، پودر، شیر حرارت دیده (Heat-Treated Milk) و محصولات شیری فرآیند شده را ۵۰ نانوگرم در کیلوگرم (۰/۰۵ µg/l) تعیین کرد و نباید از این میزان تجاوز نماید (۱۱). بهرحال طبق استاندارد US (US regulations) میزان آفلاتوکسین M_1 نباید از ۵۰۰ نانوگرم در کیلوگرم (µg/l۰/۵) بیشتر باشد (۱۰). در استرالیا و سوئیس این میزان در مواد غذائی کودکان به ۱۰ نانوگرم در کیلوگرم کاهش یافته است (۱۲). حد مجاز آلودگی AFB_1 در جیره غذائی دام ۵ µg/kg است.

سایر مایکوتوکسین ها ممکن است حتی در مقادیر کم در شیر و محصولات لبنی وجود داشته باشند. که از آن جمله می توان از AFB_1، AFG_1، AFM_2، AFM_4، استریگماتوسیستئین، اخراتوکسین، T_2 و فومونیسین نام برد (۱۳–۱۷). برای سنجش آفلاتوکسین می توان از روشهای متعددی، نظیر کروماتوگرافی لایه نازک(TLC)، کروماتوگرافی مایع (LC)، کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا (HPLC) و ELISA استفاده نمود (۲و۱۸–۲۸). لذا هدف از این مطالعه مقایسه میزان AFM_1 شیر پاستوریزه مصرفی در فصول زمستان و تابستان در شهر بابل می باشد.

مواد و روشها

مطالعه به صورت مقطعی بر روی ۱۴۴ نمونه شیر پاستوریزه که در طی فصول زمستان ۱۳۸۴ و تابستان ۱۳۸۵ از سوپر مارکتهای ۵ منطقه شمالی، جنوبی، غربی، شرقی و مرکزی شهر بابل، جمع آوری شده بود انجام شد. میزان ۱۵–۱۰ میلی لیتر از نمونه شیر در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰xg سانتریفوژ شد. سپس چربی روئی را بطور کامل بوسیله پیپت پاستور دور ریخته و مایع زیرین (Skimmed Milk) جهت آزمایش AFM_1 در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. کیت الایزا ۹۶ تایی آفلاتوکسینM_1, Tecna ایتالیا (cat.N. MA440-MA441) برای شناسائی AFM_1 مورد استفاده قرار گرفت. این یک روش ایمونوآسی آنزیم رقابتی است. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه فوق به هر چاهک اضافه شد و همزمان ۷ استاندارد این کیت به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۷ چاهک اول اضافه شدند. سپس در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه گردیدند. عمل شستشو چهار بار با بافر 20x صورت گرفت. آنگاه بعد از اضافه کردن محلول گونژوکه و ۱۵ دقیقه انکوباسیون، مجددا چهار بار مورد شستشو قرار گرفتند. سپس سوبسترا و همزمان بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون، محلول متوقف کننده اضافه گردید و در نهایت با الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. اطلاعات با آزمون آماری ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و $p<۰/۰۵$ معنی دار تلقی گردید.

یافته ها

میزان آلودگی AFM_1 شیر پاستوریزه در ماه های دی، بهمن، اسفند، تیر، مرداد و شهریور صددرصد بود و میانگین آن به ترتیب ۲۲۷/۸۵، ۲۲۹/۶۴، ۲۳۳/۱، ۱۱۰/۴، ۱۲۰/۱۷ و ۱۱۲/۴۸ نانوگرم در لیتر مشخص گردید. در فصل زمستان ۹۱/۵٪ نمونه ها بیش از ۲۰۰ نانوگرم در لیتر آلودگی داشتند و فقط ۸/۵٪ از نمونه ها بین ۱۵۰ تا ۲۰۰ نانوگرم در لیتر آلودگی داشتند، در صورتی که در فصل تابستان صد درصد نمونه ها بین ۱۵۰–۱۰۱ نانوگرم در لیتر آلودگی داشتند. بطور کلی میزان آلودگی آفلاتوکسین M_1 در فصل زمستان بین ۲۵۳/۵ ng/l تا ۱۷۸/۸ ng/l و میانگین آن ۲۳۰/۲ ng/l

[DOR: 20.1001.1.15614107.1386.9.5.4.3]

بود و فصل تابستان بین ۱۳۲/۷ ng/l تا ۱۰۳/۳ ng/l و میانگین آن ۱۱۴/۳۵ ng/l بود. ۱۰۰٪ نمونه ها آلودگی بیش از حد مجاز کمیته اروپائی و غذائی کودکس (ng/l۵۰) داشتند. به عبارتی میزان آلودگی AFM_1 شیر پاستوریزه مصرفی شهر بابل در فصل زمستان بیش از چهار برابر حد استاندارد فوق بود، در صورتی که در فصل تابستان بیش از دو برابر بود. بین میزان آلودگی آفلاتوکسین M_1 شیر در ماه های مختلف اختلاف معنی داری مشاهده نشد (جدول۱و ۲).

جدول ۱. توزیع فراوانی AFM_1 در شیر پاستوریزه مصرفی شهرستان بابل در زمستان ۱۳۸۴

ماه	Mean±SE	S.D	max	min
دی	۲۲۷/۸۵± ٤/۹۸	۱۷/۹٦	۲۵۳/۵	۱۷۸/۸
بهمن	۲۲۹/٦٤± ٤/۱۹	۱۵/۱۲	۲۵۲/۱	۱۹۳/٦
اسفند	۲۳۳/۱± ٤/۰۷	۱٤/٦۷	۲۵۰	۱۹۹/۳
جمع	۲۳۰/۲± ۱/۸۹	٦/۸٤	۲۵۳/۵	۱۷۸/۸

جدول ۲. توزیع فراوانی AFM_1 در شیر پاستوریزه مصرفی شهرستان بابل در تابستان۱۳۸۵

ماه	Mean±SE	S.D	max	min
تیر	۱۱۰/٤±۰/۷۷	۱/۸۸	۱۱۳/۱	۱۰۷/٤
مرداد	۱۲۰/۱۷±٤/۱٤	۱۰/۱۵	۱۳۲/۷	۱۰۳/۳
شهریور	۱۱۲/٤۸±۲/۷۱	٦/٦۳	۱۲۰	۱۰٤/٤
جمع	۱۱٤/۳۵±۰/۹۹	۲/٤۳	۱۳۲/۷	۱۰۳/۳

بحث و نتیجه گیری

میزان آلودگی AFM_1 در شیر این نواحی بالا بود. لذا با توجه به اهمیت گروه شیر و فراورده ها، لازم است تدابیر خاص جهت حفاظت جیره غذائی دام از کپک های آفلاتوکسین و کیفیت شیر به عمل بیاید. در ترکیه Bakirci و همکاران AFM1 را از ۷۹ نمونه از ۹۰ نمونه خام جدا نمودند. ۳۵ مورد (۴۴/۳۰٪) از نمونه های مثبت بالاترین میانگین حد مجاز (۰/۰۵ ppb) استاندارد را نشان دادند. اختلاف معنی داری بین غلظت AFM_1 نمونه شیر بدست آمده از ماه اسفند تا فروردین و اسفند تا اردیبهشت وجود داشت. از سوی دیگر بین میانگین غلظت AFM_1 نمونه شیر بدست آمده از فروردین تا خرداد و اردیبهشت تا خرداد اختلاف معنی داری مشاهده شد. کمترین میران AFM_1 در شیر خام ppb ۰/۰۳۰۲ در ماه خرداد و بیشترین آن ppb ۰/۰۶۳۶ در فروردین بود. ۴۰٪ نمونه شیر خام در ماه خرداد AFM_1 نداشته اند (۱۹).

Panariti در Albania طی بررسی بر روی ۱۲۰ نمونه شیر خام در فصول زمستان و تابستان نشان داد که میزان آلودگی AFM_1 شیر خام زمستان بالاتر از شیر خام تابستان بود. ۱۳٪ شیر زمستان بالاتر از حد µg/kg۰/۵ بودند. در حالیکه ۳٪ شیر تابستان بالا تر از حد استاندارد ۰/۵ µg/kg بود (۲۸). در ترکیه Gurbay و همکاران با بررسی بر روی ۲۷ نمونه شیر نشان دادند که ۵۹/۳٪ آنها آلوده بودند که فقط یک نمونه بیش از حد مجاز اتحادیه اروپا بود (۲۷). کاهش AFM_1 در ژاپن به دلیل فرهنگ سازی مناسب تولید و نگهداری غذای دام ها به صورت سالم و بهداشتی می باشد. کریم و همکاران از ۷۳ نمونه شیرهای تحویلی به کارخانجات شیر پاستوریزه تهران ۶۰ نمونه (۸۲/۲٪) آلودگی به AFM_1 به میزان بیش از حد مجاز استاندارد اتحادیه اروپا (۵۰ نانوگرم در لیتر) را عنوان کردند. هم چنین در مطالعه دیگری توسط همین محقق ۵۲ نمونه شیر مایع ۴۸ مورد (۹۲/۳٪) آلودگی با غلظت بین ۲۳ و ۳۰۰۰ داشتند (۲۹).

کامکار در شهر سراب از ۱۱۱ نمونه شیر خام، ۸۵ مورد (۷۶/۶٪) آلودگی با غلظت بین ۰/۰۱۵ و ۰/۲۸ µg/l را گزارش نمود. حدود ۴۰٪ نمونه های مثبت، بالاترین حد مجاز (۰/۰۵) اتحادیه اروپا را دارا بودند (۱۶). البرزی و همکاران نیز در شهر شیراز با بررسی بر روی ۶۲۴ نمونه شیر پاستوریزه در بهار و تابستان ۱۰۰٪ آلودگی را گزارش کردند که ۱۷/۸٪ نمونه ها بیشتر از حد مجاز اتحادیه اروپا بودند (۲۴). در صورتی که در مطالعه ما در صد آلودگی صددرصد بود. در شمال ایران با توجه به شرایط مناسب محیطی در رشد کپک های آفلاتوکسین بخصوص در فصول سرما باید تدابیری در جهت تهیه، تولید و نگهداری منابع غذائی حیوانی اتخاذ گردد.

نتایج نشان می دهد که میزان آلودگی در شیر در اکثر کشورها در حال کاهش می باشد و این امر به خاطر جدی گرفتن و بهداشتی نمودن کیفیت تغذیه دام است. یافته های این مطالعه نشان می دهد که میزان آفلاتوکسین در شیر بالا است با توجه به اینکه بیشتر گروه های سنی به ویژه کودکان و نوجوانان ... در سطح

[DOR: 20.1001.1.15614107.1386.9.5.4.3]

وسیعی از گروه شیر و فراورده ها استفاده می کنند، این مسئله از نظر بهداشت عمومی بسیار اهمیت دارد. بنابراین با اتخاذ تدابیر مناسب در جهت رسیدن به حد استاندارد می تواند از میزان AFM1 در مواد غذایی با آموزش و تغییر در فرهنگ تغذیه ایی کاست.

****

References

1. Van Egmond HP. Mycotoxin. International Dairy Federation, Special Issue 1991; 9101: 131–45.

2. Aycicek H, Aksoy A, Saygi S. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. Food Control 2005; 16(3): 263-6.

3. Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxico Lett 2002; 127(1-3): 19-28.

4. Brackett RE, Marth EH. Fate of aflatoxin M_1 in Parmesan and Mozzarella cheese. J Food Prot 1982; 45: 597–600.

5. Ricordy R, Coacci R, Augusti OF. Aflatoxin B_1 and cell cycle perturbation. Food and Nutrition Toxicity 2004; 4: 213-33.

6. Dragacci S, Gleizes E, Fremi JM, Candlish AAG. Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M1 in cheeses. Food Add Contam 1995; 12(1): 59–65.

7. Kocabas CD, Sekerel BE. Does systemic exposure to aflatoxin B_1 cause allergic sensitization? Allergy 2003; 58: 347-52.

8. Deshpande SS. Fungal toxins. In: S.S. Deshpande, Editor, Handbook of food toxicology, New York, Marcel Decker 2002; pp: 387–456.

9. Park DL. Effect of processing on aflatoxin. Adv Exp Med Biol 2002; 504: 173–9.

10. Stoloff L, Van Egmond HP, Park DL. Rationales for the establishment of limits and regulations for mycotoxins. Food Add Contam 1991; 8(2): 222–31.

11. Food and Agriculture Organization, Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003, Food and Agriculture Organization. Rome 2004; FAO Food and Nutrition; pp: 81.

12. Margolles E, Escobar A, Acosta A. Aflatoxin B1 residuality determination directly in milk by ELISA. Revista De Saude Alimentation 1992; 12: 35–8.

13. Cirilli G, Aldana G, Cirilli GS. Contamination of dairy products by hydroxy-aflatoxins. Microbiol, Aliments, Nutr 1988; 6: 217–19.

14. Van Egmond HP, Paulch VH. Mycotoxins in milk and milk products. Neth Milk Dairy J 1986; 40: 175–88.

15. Maragos CM, Richard JL. Quantitation and stability of fumonisins B_1 and B_2 in milk. J AOAC Int 1994; 77(5): 1162-7.

16. Kamkar A. A study on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. Food Control 2005; 16(7): 593-9.

17. Bakirci I. A study on the occurrence of aflatoxin M_1 in milk and milk products produced in Van province of Turkey. Food Control 2001; 12: 47-51.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1386.9.5.4.3]

18. Kamkar A. A study on the occurrence of aflatoxin M_1 in Iranian Feta cheese. Food Control 2005; 16(3): 257-61.

19. Roussi V, Govaris A, Varagouli A, Botsoglou NA. Occurrence of aflatoxin M_1 in raw and market milk commercialized in Greece. Food Addit Contam 2002; 19(9): 863-8.

20. Rodriguesz Velasco ML, Calonge Delso MM, Ordonez Escudero D. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M_1 in raw milk. Food Addit Contam 2003; 20(3): 276-80.

21. Srivastava VP, Bu Abbas A, Alaa Basuny W, Al Johar, Al Mufti S, Siddiqui MK. Aflatoxin M1 contamination in commercial samples of milk and dairy products in Kuwait. Food Addit Contam 2001; 18(11): 993–7.

22. Martins ML, Martins HM. Aflatoxin M_1 in yoghurts in Portugal. Intl J Food Microbiol 2004; 91(3): 315-17.

23. Manetta AC, Di Giuseppe L, Giammarco M, Fusaro I, Simonella A, Gramenzi A, Formigoni A. High-performance liquid chromatography with post-column dramatization and fluorescence detection for sensitive determination of aflatoxin M_1 in milk and cheese. J Chromatogr A 2005; 1083(1-2): 219-22.

24. Alborzi S, Pourabbas B, Rashidi M, Astaneh B. Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Shiraz (South of Iran). Food Control 2006; 17(7): 582-4.

25. Rastogi S, Dwivedi PD, Khanna SK, Das M. Detection of Aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. Food Control 2004; 15(4): 287–90.

26. Yaroglu T, Oruc HH, Tayar M. Aflatoxin M_1 levels in cheese samples from some provinces of Turkey. Food Control 2005; 16(10): 883-5.

27. Gurbay A, Aydın S, Girgin G, Engin AB, Sahin G. Assessment of aflatoxin M_1 levels in milk in Ankara, Turkey. Food Control 2006; 17(1): 1-4.

28. Panariti E. Seasonal variations of aflatoxin M_1 in the farm milk in Albania. Arh Hig Rada Toksikol 2001; 52(1): 37-41.

29. Karim G. Study on the contamination of raw bulk milk with aflatoxin M1 in Tehran area using ELISA method. Journal of Pajoohesh and Sazandeghi 1998; 40–2: 163–5.

* آدرس نویسنده مسئول: دانشگاه علوم پزشکی بابل، بخش قارچ و انگل شناسی، تلفن: ۵-۲۲۲۹۵۹۱-۰۱۱۱.

Sepid_lab@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1386.9.5.4.3]