

سنجهش حضور آفلاتوکسین₁ در نمونه‌های آغوز‌گاوی خشک شده بالیوفیلیزاسیون و اسپری دراینگ

ابوالفضل کامکار^{۱*} محمدربانی^۲ اشکان جبلی جوان^۳ محمدرضا مخبر دزفولی^۴ فریدون رضازاده^۵

- (۱) گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران.
- (۲) بخش زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان، اصفهان- ایران.
- (۳) گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان- ایران.
- (۴) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران.
- (۵) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز، تبریز- ایران.

(دریافت مقاله: ۱۷ آذر ماه ۱۳۸۷، پذیرش نهایی: ۱۲ مهر ماه ۱۳۸۸)

چکیده

آفلاتوکسین₁ در مقایسه با سایر مایکوتوكسین‌ها به میزان بیشتری در شیر و فراورده‌های شیری یافت می‌شود. فرآورده‌های شیری از جمله آغوز نیز در صورت تغذیه دام‌های شیری از جیره‌های آلوده به آفلاتوکسین₁ B₁ به این سم آلوده می‌شود. این مطالعه به منظور تعیین وضعیت حضور و میزان آفلاتوکسین₁ در نمونه‌های آغوز لیوفیلیزه و اسپری دراینگ تهیه شده از گاوداری‌های اطراف تهران صورت گرفت. در این مطالعه از آزمایش الایزای رقابتی جهت تشخیص آفلاتوکسین₁ M₁ بر روی ۲۵ نمونه آغوز استفاده گردید. نتایج حاصله نشان داد که درصد نمونه‌های آغوز به آفلاتوکسین₁ M₁ آلوده بوده و محدوده آلودگی بین ۱۶ تا ۱۱۷۶ نانوگرم در لیتر قرار داشت. میانگین آفلاتوکسین₁ M₁ آغوز در این مطالعه ۲۱۳/۳۷ نانوگرم در لیتر بود. در درصد از نمونه‌های آلوده، میزان سم بالاتر از حد استاندارد ۵۰ نانوگرم در لیتر (استاندارد اتحادیه اروپا) و درصد بالای حد استاندارد ۵۰۰ نانوگرم در لیتر (آمریکا) بود. با توجه به مخاطرات مهم ناشی از آفلاتوکسین برای سلامتی انسان و آلودگی درصدی از نمونه‌های آغوز مورد مطالعه، انجام مطالعات گسترشده جهت تشخیص آلودگی به آفلاتوکسین در نمونه‌های آغوز در کشور توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین₁ M₁، آغوز، الایزا.

آن‌ها آفلاتوکسین₁ B₁ از همه خطرناکتر می‌باشد (۲۴).

اگر حیوان از غذای آلوده به آفلاتوکسین₁ B₁ مصرف کند در بدن دام به نوع M₁ تبدیل و در شیر دام ظاهر می‌شود. این تغییر و تبدیل در کبد دام صورت می‌گیرد. این آفلاتوکسین از غدد پستانی گاوهای شیری به درون شیر ترشح می‌شود. اثرات M₁ از نوع B₁ کمتر ولی تقریباً شبیه آن می‌باشد. در مقالات زیادی گزارش شده که بین میزان آفلاتوکسین₁ در شیر و آفلاتوکسین₁ در غذای دام ارتباط مستقیم یا خطی وجود دارد (۱).

از جمله ترکیبات مهم با منشاء گاوی که در سالیان اخیر استفاده از آن برای مصارف انسانی نیز توسعه پیدا کرده است کلسترولم می‌باشد. کلسترولم گاوماده‌ای غنی از عوامل ایمنی بخش، عوامل رشد و ترمیم بافتی است که استفاده از آن در پیشگیری یا درمان عفونت‌های ناشی از عوامل عفونی مختلف (۴، ۶، ۱۷، ۲۶)، اختلالات گوارشی (۲۲)، تقویت رشد و غیره (۶) مورد مطالعات گسترشده قرار گرفته و بعض‌ابه صورت فرآورده‌های تجاری نیز به بازار راه یافته است.

با توجه به این که امروزه این فرآورده به طور اسپری دراینگ یا لیوفیلیزه مورد مصرف قرار می‌گیرد و در فرآورده‌های لبنی وجود آفلاتوکسین₁ M₁، محتمل است در این تحقیق حضور این سم قارچی در نمونه‌های کلسترولم لیوفیلیزه و اسپری دراینگ برای اولین بار در ایران مورد مطالعه قرار گرفته است.

مقدمه

آشنا نودن اکثریت کشاورزان و صاحبان دام به شرایط رشد و نمو میکروگانیسم‌ها، بخصوص قارچ‌ها، سالانه به طور مشهود خسارات مالی قابل توجهی و به شکل غیر معمول صدمات جسمی و جانی قابل تأملی را به جمعیت انسان و دام در کشور مواردی کند.

برخی قارچ‌های مدت رشد خود ببروی مواد غذایی، علاوه بر کاهش ارزش غذایی متابولیت‌های ثانویه‌ای به نام سوموم قارچی تولید مینمایند که برای سلامتی انسان و موجودات خطرناک هستند و پیامد دریافت این سوموم توسط موجود زنده می‌تواند اثرات سمی، سرطان‌زایی، ناقص الخلقه‌زایی، جهش زایی و کاهش رشد باشد (۵).

آفلاتوکسینهای گروه بزرگی از سوموم قارچی هستند که توسط گونه‌های خاصی از جنس آسپریلیوس شامل آسپریلیوس flavous (Aspergillus parasiticus)، پارازیتیکوس (Aspergillus parasiticus) و نومیوس (Aspergillus nomius) تولید می‌شوند. این گروه از سوموم قارچی به عنوان سرده‌سته تمامی سوموم قارچی محسوب می‌شوند به همین دلیل بیش از سایر سوموم قارچی مورد توجه محققان و مراجع بهداشتی قرار گرفته‌اند. تاکنون بیش از ۱۸ نوع آفلاتوکسین شناخته شده است که از میان آن‌ها انواع G₁، A₁ و M₁ بیشترین اهمیت را دارند، که در بین



جدول ۱- وضعیت آلودگی نمونه های آغوز گاوی لیوفیلیزه و اسپری دراینگ.

به آفلاتوکسین M ₁ (نانو گرم در لیتر)							
انحراف معيار	حداقل	حداکثر	ميانگين	N>50ng/l	M>500ng/l	درصد آلودگی	تعداد
۲۵۰/۲۱	۱۶	۱۱۷۶	۲۱۳/۳۷	%۹۲	%۶۴	%۷۶	۲۵

روش آنالیز آماری: داده های جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS و با روش های آمار توصیفی (محاسبه نسبت آلودگی، میانگین و انحراف معيار) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه در جدول ۱ آمده است. ۷۶ درصد نمونه های مورد مطالعه از لحاظ آلودگی به آفلاتوکسین M₁ مثبت بودند و از میان ۲۵ نمونه تعداد ۱۹ نمونه آلودگی بالاتر از حد استاندارد ۵۰ نانو گرم در لیتر (استاندارد اتحادیه اروپا) را نشان می دادند که در واقع ۹۲ درصد از کل نمونه ها را شامل می شد. ضمناً در مقایسه با حد استاندارد ۵۰۰ نانو گرم در لیتر (استاندارد آمریکا)، غلظت آلودگی آفلاتوکسین M₁ در ۹۶ درصد نمونه هادر حد مجاز بود. محدوده آلودگی به طور کلی بین ۱۱۷۶ تا ۱۶ نانو گرم در لیتر در این مطالعه بدست آمد.

بحث

در کشورهایی که دارای صنعت دامداری پیشرفته هستند تحقیقاتی جهت تعیین وضعیت آلودگی شیر و فراورده های آن به AFM₁ انجام شده است (۲۵، ۲۳، ۷، ۸، ۱۲، ۱۳، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۳).

در ایران نیز در سال ۱۳۶۱ ادر مطالعه ای که توسط کریم و همکاران صورت گرفت با استفاده از روش کروماتوگرافی روی لایه نازک تعداد ۶۱ نمونه شیر شامل ۵۲ نمونه شیر دامداری های 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 بر اساس استاندارد اتحادیه اروپا آلوده به AFM₁ بودند. این محققین میزان آلودگی به AFM₁ را در شیرهای خام بین ۱۰-۶ میکرو گرم در لیتر و در شیرهای پاستوریزه ۵-۱ میکرو گرم در لیتر گزارش نمودند (۱۵).

همچنین کریم و خراسانی در سال ۱۳۷۵ با بررسی ۷۳ نمونه از شیرهای تحويلی به کارخانه شیر پاستوریزه تهران با استفاده از روش الیزانشان دادند که ۸۲/۲ درصد نمونه ها آلوده به AFM₁ بودند که در تمامی موارد غلظت این توکسین بالاتر از حد مجاز استاندارد کشورهای اروپایی (EC) (یعنی ۵۰ نانو گرم در لیتر بود). میانگین آلودگی بدست آمده ۲۵۹/۵ نانو گرم در لیتر با حدود تعییرات ۴۶۳-۵۶ نانو گرم در لیتر بوده است (۱۶).

در مطالعه کامکاردر سال های ۲۰۰۲ و ۲۰۰۸ که روی ۵۲ و ۶۴ نمونه شیر استریلیزه انجام گرفت به ترتیب ۷۹/۹۲ و ۱۰۰ درصد نمونه ها آلوده به آفلاتوکسین بوده و دارای محدوده آلودگی ۴۰/۱۹ تا ۶۰ تا ۳۸۷ نانو گرم

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه ها: به منظور انجام این تحقیق نمونه های کلستروم طی ۲۴ ساعت پس از زایش از گاو های هشتادیان ایرانی تهیه گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

لیوفیلیزاسیون: این کار روی ۲۵ نمونه آغوز با استفاده از دستگاه (Epilson-۱-۱۲D, Martin Christ.Germany) انجام شد. مدت زمان انجام ۴ ساعت در ۳۰- درجه سانتیگراد بود و مدت زمان ایجاد خلاء نیز ۱۹ ساعت در فشار ۱/۳۰ میلی باربود.

اسپری دراینگ: تعداد ۲۵ نمونه کلستروم با استفاده از دستگاه (Buchi Switzerland-B-۱۹۱) خشک گردید. حداکثر دمای بکار رفته ۵۰ درجه سانتیگراد بوده و فشار برابر ۸-۵ میلی بار بود. مدت زمان مورد نیاز برای پودر کردن یک لیتر کلستروم ۵ ساعت بود.

اندازه گیری آفلاتوکسین M₁: بر اساس دستور العمل شرکت سازنده کیت (R- Biopharm, Germany) (۵۰ درجه فارنهایت) به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۳۵۰۰g سانتریفیوز گردیدند. پس از سانتریفیوز لایه بالای نمونه ها با استفاده از پیپت پاستوری به طور کامل برداشته شد. از قسمت بدون چربی به طور مستقیم جهت آزمایش استفاده گردید (۱۰۰ میکرو لیتر به ازای هر گره). به تعداد کافی از گوده های میکرو تیتر برای اندازه گیری استانداردها و نمونه ها استفاده گردید.

مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول های استاندارد یا نمونه به طور مجزا به حفره های دوتایی مورد نظر اضافه شده عمل مخلوط کردن به طور دستی با ملایمت و از طریق تکان دادن پلیت انجام گرفته و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۰-۲۵ درجه سانتیگراد) در محلی تاریک نگهداری می شد.

مایعات از داخل حفره ها خارج شده و سه مرتبه به طور محکم ظرف نگهدارنده بصورت وارونه بر رروی کاغذ جذب کننده برای اطمینان از خروج کامل آنها زده شد. سپس تمام گوده ها با ۲۵۰ میکرو لیتر از بافر شستشو پر و خالی شده این شستشو دوبار تکرار گردید.

مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول رقیق شده کنزوگه آنزیم به گوده ها اضافه شده، و به آرامی با دست تکان داده شده و به مدت ۶۰ دقیقه در محلی تاریک و در دمای اتاق (۲۰-۲۵ درجه سانتیگراد) نگاه داشته شد. مرحله شستشو مانند دفعه قبل انجام شد.

مقدار ۵۰ میکرو لیتر از سوبستراو ۵۰ میکرو لیتر از محلول کروموزن به هر یک از گوده ها اضافه شده طبق همان روش دستی گفته شده عمل مخلوط کردن انجام شده و به مدت ۳۰ دقیقه در محلی تاریک و در دمای اتاق (۲۰-۲۵ درجه سانتیگراد) نگاه داشته شد.

مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول متوقف کننده به هر یک از گوده ها اضافه شده و طبق روش گفته شده مخلوط گردیده و میزان جذب نور در طول ۴۵۰ نانومتر در مقابل شاهد اندازه گرفته شد سپس با کمک نرم افزار تهیه شده توسط شرکت سازنده کیت نهایتا میزان آفلاتوکسین محاسبه گردید.



References

- Alcroft, R., Roberts, B.A. (1968) The relationship between AFB₁ intake by cows and excretion of AFM₁ in milk. *Vet. Rec.* 82: 116 -118.
- Aycicec, H., Abdurrahman, A. (2004) Control of AFM1 contamination in dairy products in Turkey. *Food. Cont.* 16: 263- 266.
- Bakirci, I. (2001) A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Cont.* 12: 47-51.
- Casswall, T. (1998) Treatment of Helicobacter pylori infection in infants in rural Bangladesh with oral immunoglobulin from hyperimmune bovine colostrum. *Aliment. Pharmacol.Ther.* 12: 563-668.
- Creppy, E. E. (2002) Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Letter.* 127: 19-28.
- Ebina, T. (1983) Prevention of rotavirus infection by cow colostrum containing antibody against human rotavirus. *Lancet.* 29:1029- 1030.
- 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 Addit. Contam.* 18: 644-646.
- Garrido, N .S. (2003) Occurrence of AFM₁ and milk commercialized in Riberio Brazil. *Food Addit. Contam.* 120: 70-73.
- Hafez, A. H., Megalla, S. E., Mohran, M. A., Nassar, A.Y. (1985) Aflatoxin & aflatoxicosis: The kinetic behavior of dietary aflatoxins in colostrum drawn from cows postpartum. *Mycopatol.* 3: 761-764.
- Kamkar, A. (2002) Study on the contamination of UHT milks with aflatoxin M₁ in the city of Tehran. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran.* 57:5-8
- Kamkar A. (2005) A study on the occurrence of AFM1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Cont.* 16: 593- 599.
- Kamkar, A. (2005) The study on the contamination of aflatoxin in White cheese marketed in Tehran by thin layer chromatography. *IJFST.* 2:71-79
- Kamkar, A., (2006) A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in Iranian Feta cheese. *Food Cont.* 17:768-77.

در لیتریوندند (۱۰، ۱۴).

در بررسی دیگر کامکار روی شیرهای تولیدی در شهرستان سراب ۷۶/۶ درصد نمونه‌های شیر خام تولیدی مورد مطالعه حاوی آفلاتوکسین M₁ بود ند که در ۴۰ درصد آن‌ها غلظت سم بالای حد مجاز اتحادیه اروپا بود (۱۱).

در مورد حضور آفلاتوکسین در کلستروم در ایران تا کنون مطالعه‌ای صورت نگرفته و در دنیا نیز مطالعات اندکی وجود دارد. در مطالعه Hafez همکاران در سال ۱۹۸۵ پس از آلوده‌سازی تجربی دو گاو آبستن به آفلاتوکسین در مرحله آخر آبستنی (دو هفته قبل از زایمان) حضور متabolیت‌های سمی و کنثوگه‌های آن با الکتروفورز (Electrophoresis) که از متabolیت‌های سمی مورد بررسی قرار گرفت و حضور AFM_{2a}, AFM₁ می‌باشدند در کلستروم نشان داده شد. متabolیت‌های دفع شده از جمله AFB_{2a} به بخش پروتئینی ایمونوگلوبین کلستروم کنثوگه شده بود (۹).

در مطالعه حاضر که برای نخستین بار در کشور صورت گرفت حضور آفلاتوکسین M₁ در کلستروم گاوها با روش الیزا ارزیابی شد و نتایج نشان دهنده این واقعیت است که درصد بالای از آن‌ها دارای سم بوده و در بسیاری از نمونه‌های غلظت سم بسیار بالا می‌باشد. بنابراین با توجه به مطالعه که ذکر شد، و همچنین نتایجی که در این تحقیق بدست آمد و با توجه به اهمیت بالای آفلاتوکسین در بهداشت مواد غذایی و سلامت انسان و دام و به علت مشکلات فراوانی که در ارتباط با سم زدایی شیر و فرآورده‌های آن از AFM₁ وجود دارد. به نظر می‌رسد که در حال حاضر بهترین راه مقابله در آلوگی قارچی برای دام‌های شیری در دامداری‌های است که هم سلامت عمومی دام و افزایش تولید آن حفظ می‌شود و هم سلامت جامعه تامین می‌گردد، با توجه به این که این روند همواره قابل انجام نیست استفاده از روش‌های زیر توصیه می‌شود:

۱- با توجه به این که 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) خوارک دام در دمای پایین تراز این محدوده نگهداری شود.

۲- چون رشد سویه‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس و تولید سم نیازمند رطوبت بالای ۱۴ درصد و حرارت حدود ۲۵ درجه سانتیگراد بوده و کاهش اکسیژن تولید آفلاتوکسین را کم می‌کند توصیه می‌شود که محیط نگهداری خوارک دام دارای دما و رطوبت کمتر از مقدار فوق باشد و در صورت امکان اکسیژن در این قسمت کاهش داده شود.

۳- استاندارد مربوط به حد مجاز آلوگی شیریه AFM₁ در کشور رعایت شود.

در پایان ادامه و تعمیق مطالعه حاضر در رابطه با سنچش آفلاتوکسین در نمونه‌های کلستروم توصیه می‌شود.



14. Kamkar, A. (2008) The study of aflatoxin M₁ in UHT milk samples by ELISA. *J. Vet. Res.* 63:7-12
15. Karim, G., Parvaneh, V., Kordi, J. (1983) Study on the contamination of milk with aflatoxin in Tehran area. *J. Iranian Pub. Healt.* 11: 75-84.
16. Karim, G., Khorasani, A. (1998) Study on the contaminatin of raw bulk milk with aflatoxin M₁ in Tehran area using ELISA method. *J. Pagouhesh-va-Sazandegi.* 4: 163-165.
17. Kelly, G. S. (2003) Bovine colostrum: A review of clinical uses. *Alt. Med. Rev.* 8: 378-394.
18. Korhonen, H., Marlina, P., Gill, H. S. (2002) Bovine milk antibodies for health. *Br. J. Nutr.* 84: 135- 146.
19. 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 Cont.*14: 31-34.
20. Martins, M. L., Martins H. M. (2000) Aflatoxin M₁ in raw and ultra high temperature - treated milk commercialized in Portugal. *Food Addit. Contam.*17: 871-874.
21. 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 Addit. Contam.*14: 7 - 10.
22. Playford, R. J., Macdonald, C. E., Johnson W. S. (2000) Colostrum and milk- derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 5-14.
23. 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 Cont.* 15:287-290.
24. Rustom, I. Y. S. (1997) Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem.* 59:57-67.
25. Sarimehmetoglu, B., Kuplulu, O., Celik, T. H. (2004) Detection of aflatoxin M₁ in cheese samples by ELISA. *Food Cont.*15: 287-290.
26. Uruakpa, F. O., Ismond , M. A. H., Akobundu, E. N. T. (2002) Colostrum and its benefits; a review. *Nutr. Res.* 22: 755- 767.



DETECTION OF AFLATOXIN M1 IN SPRAY DRIED AND LYOPHILIZE BOVINE COLOSTRUM PRODUCTS

Kamkar, A.^{1*}, Rabbani, M.², Jebelli Javan, A.³, Mokhber-Dezfuli, M.⁴, Rezazadeh, F.⁵

¹Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

²Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan-Iran.

³Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Semnan, Semnan-Iran.

⁴Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

⁵Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine University of Tabriz, Tabriz-Iran.

(Received 7 December 2008 , Accepted 4 October 2009)

Abstract:

Aflatoxin M₁ (AFM₁) is an important mycotoxin frequently found in milk and dairy products. Dairy products and colostrum may be contaminated by aflatoxin M₁ when dairy cattle have fed with aflatoxin B₁-contaminated feeds. This study was undertaken in a dairy farm around Tehran province to determine the presence and level of aflatoxin M₁ (AFM₁) in spray dried and lyophilized colostrum samples. In this study, 25 spray dried and lyophilized colostrum samples were analyzed using competitive ELISA for determining the presence and levels of AFM₁. AFM₁ was found in 76% of the colostrum samples. The range of contamination level was 16 ng/l to 1176 ng/l, (mean value was 213.37 ng/l). Ninety two percent of the contaminated samples exceeded the maximum acceptable levels (50 ng/l, EU standard) and 8% exceeded 500 ng/l. Due to human health hazard and high occurrence of AFM₁ in colostrum samples, monitoring programs should be more extensive and frequent in Iran.

Key words: aflatoxin M₁, colostrum, ELISA.

*Corresponding author's email:akamkar@ut.ac.ir, Tel: 021-61117042, Fax: 021-66933222

