

## سنجش آفلاتوکسین M<sub>1</sub> در شیر پاستوریزه و استریلیزه مصرفی شهر بابل

### چکیده

عیسی غلامپور عزیزی<sup>۱</sup>

سید حسن خوشنویس<sup>۲</sup>

سید جمال هاشمی<sup>۳\*</sup>

۱. گروه قارچ‌شناسی، دانشکده دامپزشکی

۲. گروه پرستاری و مامایی

دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل

۳. بخش قارچ‌شناسی، دانشکده بهداشت،

دانشگاه علوم پزشکی تهران

\* نویسنده مسئول: دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، بخش قارچ‌شناسی ص پ: ۶۴۴۶-۱۴۱۵۵

تلفن: ۸۸۹۵۱۵۸۳

email: sjhashemi@tums.ac.ir

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین M<sub>1</sub>، شیر، الیزا.

### مقدمه

آفلاتوکسین‌ها Aflatoxins میکوتوکسین‌های شدیداً سمی بوده و در اکثر محصولات گیاهی نظیر بادام زمینی، پسته، نارگیل، سویا، ذرت، برنج، پنبه دانه و گندم یافت می‌شوند و عمدتاً توسط قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس و آسپرژیلوس نومینوس تولید می‌شوند. آفلاتوکسین B<sub>1</sub>، B<sub>2</sub>، G<sub>1</sub>، G<sub>2</sub> و M<sub>2</sub> (متابولیت‌های که در شیر یافت می‌شوند) متابولیت‌های semi-dihydrofuran یا tetrahydrofuran هستند که به حلقه coumarin متصل می‌باشند.<sup>۱</sup> زمانی که حیوانات جیره غذایی (feedstuff) آلوده به آفلاتوکسین B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) مصرف نمایند، این توکسین در کبد متابولیزه شده و به صورت آفلاتوکسین M<sub>1</sub> از شیر و ادرار و مدفوع ترشح می‌شوند.<sup>۲،۳</sup> آفلاتوکسین سمیت حاد، ایمنوسوپرسیو، موتاژنیک،

زمینه و هدف: میکوتوکسین‌ها سموم قارچی هستند که مهمترین آنها آفلاتوکسین‌ها می‌باشند. در پی مصرف آفلاتوکسین B<sub>1</sub> توسط دام‌های شیری، آفلاتوکسین M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) از راه شیر و لبنیات به انسان منتقل می‌شوند و به دلیل اثرات سرطان‌زایی، فعالیت سرکوب ایمنی و کاهش رشد، به‌طور بالقوه برای سلامتی انسان مخاطره‌انگیز می‌باشند. روش بررسی: در این مطالعه در طی سه‌ماه زمستان ۱۳۸۴ از سوپر مارکت‌های شهر بابل، پاکت‌های شیر پاستوریزه و استریلیزه (Ultra High Temperature) (UHT) جمع‌آوری و از نظر آفلاتوکسین M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) مورد ارزیابی قرار گرفتند. ۷۸ نمونه شیر پاستوریزه و ۳۳ نمونه شیر استریلیزه به‌طور کلی ۱۱۱ نمونه شیر پس از سانتریفوژ چربی روئی آن برداشته و مایع زیرین (skimmed milk) به‌روش ELISA رقابتی از نظر AFM<sub>1</sub> مورد سنجش قرار گرفتند. یافته‌ها: میزان آلودگی شیر پاستوریزه در ماه‌های دی، بهمن و اسفند همگی صد درصد بود و میانگین آن به ترتیب ۲۳۴/۱۲، ۲۲۲/۷۱ و ۲۳۴/۶۷ نانوگرم در لیتر (متوسط ۲۳۰/۵) مشخص گردید و میانگین آن برای شیر استریلیزه ۲۲۱/۶۶ و مشخص شد. به‌طور کلی میزان آلودگی آفلاتوکسین M<sub>1</sub> شیر پاستوریزه و استریلیزه بین ۲۵۹ ng/l تا ۱۹۳ ng/l و میانگین آن ۲۲۸/۸۱ ng/l بود. صد درصد نمونه‌ها بیش از حد مجاز کمیته اروپایی و غذایی کودکس (۵۰ ng/l) بود. به عبارتی میزان آلودگی AFM<sub>1</sub> شیر پاستوریزه و استریلیزه شهر بابل در فصل زمستان بیش از چهار برابر حد استاندارد فوق بود. با استفاده از آزمون آماری بین میزان آلودگی آفلاتوکسین M<sub>1</sub> شیر و ماه‌های مختلف ارتباط معنی‌داری وجود نداشت. نتیجه‌گیری: آلودگی آفلاتوکسین M<sub>1</sub> در شیر در این منطقه بالاتر از حد مجاز می‌باشد.

تراژژنیک و کارسینوژنیک دارا می‌باشند.<sup>۴</sup> ارگان هدف اصلی برای سمیت (toxicity) و سرطان‌زایی (carcinogenicity) آن کبد است. آفلاتوکسین M<sub>1</sub> به حرارت پاستوریزاسیون و اتوکلاو و دیگر روش‌های مراحل غذایی مقاومت نشان می‌دهند و این اقدامات در کاهش آن بی‌تاثیر می‌باشند.<sup>۵</sup> کمیته اروپایی و غذایی کودکس، ماکزیمم میزان آفلاتوکسین M<sub>1</sub> را در شیر خام، مایع و سایر محصولات شیری را ۵۰ نانوگرم در کیلوگرم (۰/۰۵ μg/l) تعیین کرد و نبایستی از این میزان تجاوز کند.<sup>۶</sup> برای سنجش آفلاتوکسین می‌توان از روش‌های متعدد، نظیر کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)،<sup>۷-۱۰</sup> کروماتوگرافی مایع (LC)،<sup>۱۱</sup> کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)<sup>۱۲-۱۶</sup> و ELISA<sup>۱۷، ۱۸، ۱۹</sup> استفاده نمود. شیر و محصولات شیری غذای اصلی انسان به‌خصوص بچه‌ها و کودکان است زیرا نسبت به عوارض آفلاتوکسین حساس‌تر

هر مکان خالی باقی مانده در مرحله بعد به وسیله توکسین لیبیل شده آنزیم کونژوگه پر می شوند. سپس آنزیم کونژوگه باند نشده شسته شده و سوبسترای آنزیم و کروموژن به چاهکها اضافه شده و سپس آنکوبه شدند. با اضافه کردن عوامل متوقف کننده رنگ آبی به زرد تغییر می یابد. جذب در طول موج ۴۵۰ nm در یک الیزا ریدر خوانده شد و پس از رسم منحنی غلظت  $AFM_1$  محاسبه گردید و به روش SPSS ویراست ۱۲ مورد تجزیه و تحلیل آماری ANOVA قرار گرفتند.

### یافته‌ها

میزان آلودگی  $AFM_1$  شیر پاستوریزه در ماه‌های دی، بهمن و اسفند همگی ۱۰۰٪ و میانگین آن به ترتیب ۲۳۴/۱۲، ۲۲۲/۷۱ و ۲۳۴/۶۷ نانوگرم در لیتر (متوسط ۲۳۰/۵) بود و میانگین آن برای شیر استریلیزه ۲۲۱/۶۶ مشخص شد (شیر استریلیزه در اواسط اسفند تولید و عرضه شده است). ۹۵٪ نمونه‌های شیر پاستوریزه بیش از  $200\text{ ng/l}$  آلودگی داشتند و فقط ۵٪ آن بین ۱۵۰ تا ۲۰۰ نانوگرم آلودگی داشتند ولی ۷۶٪ نمونه‌های شیر استریلیزه بیش از  $200\text{ ng/l}$  آلودگی داشتند و ۲۴٪ آن بین ۱۵۰ تا ۲۰۰ نانوگرم آلودگی داشتند. به طور کلی میزان آلودگی آفلاتوکسین  $M_1$  شیر پاستوریزه و استریلیزه بین  $193\text{ ng/l}$  تا  $259\text{ ng/l}$  و میانگین آن  $228/81\text{ ng/l}$  بود. ۱۰۰٪ نمونه‌ها بیش از حد مجاز کمیته اروپایی و غذایی کودکس ( $50\text{ ng/l}$ ) بود. به عبارتی میزان آلودگی  $AFM_1$  شیر پاستوریزه و استریلیزه سوپر مارکت‌های شهر بابل در فصل زمستان بیش از چهار برابر حد استاندارد فوق بود (جداول ۱ و ۲). با استفاده از آزمون آماری بین میزان آلودگی آفلاتوکسین  $M_1$  شیر و ماه‌های مختلف ارتباط معنی داری وجود نداشت.

بوده و توانایی آنها برای تغییر زیستی سرطان‌زها کندتر از بزرگسالان است. به هر حال این محصولات ممکن است آلوده شوند و برای انسان مخاطره انگیز گردند. به همین دلیل اکثر کشورها قوانینی جهت کنترل میزان آفلاتوکسین  $B_1$  در جیره غذایی دام‌ها و حد مجاز آفلاتوکسین  $M_1$  در شیر جهت کاهش این خطرات دارند. <sup>۷</sup> بسیاری از کشورها میزان شیوع آفلاتوکسین  $M_1$  شیر را مورد بررسی قرار می دهند (جداول ۱ و ۲). هدف از این مطالعه سنجش میزان  $AFM_1$  شیر پاستوریزه و استریلیزه سوپر مارکت‌های شهر بابل می باشد.

### روش بررسی

در این مطالعه ۷۸ نمونه شیر پاستوریزه و ۳۳ نمونه شیر استریلیزه (Ultra High Temperature) (UHT) از سوپر مارکت‌های شهر بابل در زمستان ۱۳۸۴ به طور هفتگی جمع‌آوری شده و از نظر آفلاتوکسین  $M_1$  (AFM<sub>1</sub>) مورد ارزیابی قرار گرفتند. هر نمونه به میزان ده میلی‌لیتر بود و در آزمایشگاه در دمای  $10^{\circ}\text{C}$  به مدت ده دقیقه با دور  $3000\text{ xg}$  سانتریفوژ شد. سپس چربی رویی را به طور کامل به وسیله پیست پاستور دور ریخته و مایع زیرین (skimmed milk) جهت آزمایش  $AFM_1$  در فریزر  $70^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شد. کیت الیزا ۹۶ تایی آفلاتوکسین  $M_1$  شرکت Tecna کشتور ایتالیا (cat.N.MA440-MA441) - (www.tecnalab.com) برای شناسایی  $AFM_1$  مورد استفاده قرار گرفت که یک روش ایمنونواسی آنزیم رقابتی و بر پایه واکنش آنتی‌ژن آنتی‌بادی است. چاهک‌های میکروتیتر با آنتی‌بادی بر علیه  $AFM_1$  پوشانده شدند. با اضافه کردن  $AFM_1$  استاندارد یا نمونه شیر، مکان‌های باند شده با آنتی‌بادی به طور نسبی به غلظت  $AFM_1$  اشغال و

جدول ۱: توزیع فراوانی  $AFM_1$  در شیر پاستوریزه و استریلیزه (UHT) مصرفی سوپرمارکت‌های شهر بابل

نوع شیر	تعداد نمونه	فراوانی مثبت	درصد مثبت	Mean ± se	S.D	max	min	فراوانی مثبت
پاستوریزه	۷۸	۷۸	۱۰۰	۲۳۰/۵ ± ۱/۴۳	۷/۲۸	۲۵۴	۱۹۳	۷۸ (٪۱۰۰)
استریلیزه	۳۳	۳۳	۱۰۰	۲۲۱/۶۶ ± ۴/۲۲	۲۴/۲۲	۲۵۹	۱۹۳	۳۳ (٪۱۰۰)
جمع	۱۱۱	۱۱۱	۱۰۰	۲۲۸/۸۱ ± ۱/۸۷	۹/۵۴	۲۵۹	۱۹۳	۱۱۱ (٪۱۰۰)

SD - انحراف معیار، (p < ۰.۰۵)

جدول ۲: توزیع فراوانی میزان شیوع  $AFM_1$  در شیر پاستوریزه و استریلیزه سوپرمارکت‌های شهر بابل

نوع شیر	< ۵۰*	۵۱-۱۰۰	۱۰۱-۱۵۰	۱۵۱-۲۰۰	۲۰۱-۲۵۰	> ۲۵۱
پاستوریزه	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۴ (٪۵)	۶۹ (٪۸۸)	۵ (٪۷)
استریلیزه	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۸ (٪۲۴)	۱۶ (٪۴۹)	۹ (٪۲۷)
جمع	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۱۲ (٪۱۲/۸)	۸۵ (٪۷۶/۶)	۱۴ (٪۱۲/۶)

\*مقدار توزیع بر حسب ng/l

جدول ۳- بررسی میزان آفلاتوکسین M<sub>1</sub> در شیر در کشورهای مختلف

کشور	نام پژوهشگر	تعداد نمونه	درصد آلودگی (>50 ng/l)	میزان غلظت	سال	منبع
ژاپن	Nakajima et al	۲۰۸	۹۹/۵	-۰/۲۹ µg/kg	۲۰۰۱	۲۶
پرتغال	martins و marnia martins	-	۱۹/۳	۰/۰۵۰-۰/۰۲۱ µg/l	۱۹۹۹	۳۱
ایتالیا	Galvano et al	۱۶۱	۰	۱-۲۳/۳ ng/l	۱۹۹۶	۲۷
Parana	Sassahara et al	۴۲	۲۴	-	۲۰۰۵	۲۸
لیبی	Elgerbi et al	۴۹	۷۱/۴	۳/۱۲-۰/۰۳ ng/ml	۲۰۰۴	۲۹
آلمان	Brezina و Fukal	۳۷۹	۰/۵	۱۰۰ ng/l	۱۹۹۱	۳۰

## بحث

پتانسیل خطرات آفلاتوکسین برای انسان در اثر مصرف شیر و محصولات شیری توسط چندین محقق به اثبات رسیده است.<sup>۱۸،۱۹</sup> خطرات آن در سلامت انسان به خصوص در سرطان کبد از طریق AFM<sub>1</sub> شیر و محصولات شیری بسیار با اهمیت است. Rastogi در هند میزان AFM<sub>1</sub> را در شیر و محصولات شیری کودکان از سوپر مارکت‌ها با روش الیزای رقابتی مورد سنجش قرار داد که از ۸۷ نمونه ۸۷/۳٪ آلودگی داشتند که محصولات شیری کودکان از نظر آلودگی (۱۰۱۲-۶۵ ng/l) بیشتر از شیر مایع (۱۶۴-۲۸ ng/l) بودند. تقریباً ۹۹٪ نمونه‌های آلوده بیش از حد مجاز کمیته اروپایی و غذایی کودک (۵۰ ng/l) بوده است، درحالی‌که ۹٪ نمونه‌ها بیش از حد مجاز استاندارد US (۵۰۰ ng/l) معین گردید.<sup>۷</sup> در یونان Markaki و Melissari با استفاده از ELISA و HPLC آفلاتوکسین M<sub>1</sub> را از شیر پاستوریزه تجاری مغازه‌ها را مورد سنجش قرار دادند. از ۸۱ نمونه شیر ۳۲ مورد شیر بین ۲-۵ ng/l و ۹ مورد بیش از ۵ ng/l و ۳۱ مورد ۱ ng/l - ۰/۵ آفلاتوکسین داشتند و ۹ مورد شیر AFM<sub>1</sub> نداشتند<sup>۲۰</sup> و در مطالعه Panariti شیرهای سرشیر گرفته یا نیمه سرشیر گرفته آلودگی کمتری نسبت به همان شیرها داشتند.<sup>۲۱</sup> در مطالعه Gurbay به وسیله HPLC از ۲۷ نمونه شیر ۵۹/۳٪ آلوده بودند که فقط یک نمونه بیش از حد مجاز اتحادیه اروپا بود.<sup>۲۲</sup> در بررسی کامکار در شهر سراب از ۱۱۱ نمونه شیر خام ۸۵ مورد (۷۶/۶٪) با غلظت بین ۰/۰۱۵ و ۰/۲۸ µg/l آلودگی داشتند. میزان ۴۰٪ نمونه‌های مثبت بالاترین حد

مجاز (۰/۰۵) اتحادیه اروپا بودند.<sup>۸</sup> البرزی در شیراز نشان داد در شهر شیراز در فصول بهار و تابستان از ۶۲۴ نمونه شیر پاستوریزه ۱۰۰٪ آلودگی وجود دارد. ۱۷/۸٪ نمونه‌ها بیشتر از حد مجاز اتحادیه اروپا (۵۰ ng/l) بودند.<sup>۲۳</sup> برای بالا بردن کیفیت شیر لازم است جیره غذایی دام بدون آلودگی AFB<sub>1</sub> باشد.<sup>۲۴</sup> 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 می‌توان دست یافت.<sup>۲۵</sup> در جدول ۳ میزان فراوانی آلودگی AFM<sub>1</sub> در شیر در کشورهای مختلف آورده شده است. میزان آلودگی در اکثر کشورها در حال کاهش می‌باشد و این امر به خاطر جدی گرفتن کیفیت تغذیه دام و بهداشتی نمودن آن است. شیر و محصولات شیری غذای اصلی انسان به خصوص بچه‌ها و کودکان است زیرا نسبت به عوارض آفلاتوکسین حساس‌تر بوده و توانایی آنها برای تغییر زیستی سرطان‌زها کندتر از بزرگسالان است. این محصولات ممکن است آلوده و مخاطره‌انگیز شوند. لذا مقرراتی در خصوص کاهش آلودگی جیره غذایی دام به کپک‌های آفلاتو-کسینوزن تعبیه شده‌اند. در این مطالعه میزان آفلاتوکسین در شیر بالا است و این موضوع برای بهداشت عمومی مسئله جدی است. شیر و محصولات شیر باید به طور مداوم حداقل سالی دوبار از نظر آلودگی AFM<sub>1</sub> مورد بررسی قرار گیرند. در کنار این، پایین بودن میزان AFB<sub>1</sub> در غذای حیوانات شیری اهمیت دارد و برای نیل به این هدف تغذیه گاوهای شیری بایستی از آلودگی احتمالی دور نگه داشته شوند.

## References

- D'Mello JPF, MacDonald AMC. Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 1997; 69: 155-66.
- Deshpande SS. Fungal toxins. In: Deshpande SS, Editor, Handbook of food toxicology. New York: Marcel Decker; 2002; p. 387-456.
- Lopez C , Ramos L , Ramadan S, Bulacio L, Perez J. Distribution of aflatoxin M<sub>1</sub> in cheese obtained from milk artificially contaminated. *Int J Food Microbiol* 2001; 64: 211-5.

4. Ricordy R, Cacci E, Augusti Tocco G. Aflatoxin B<sub>1</sub> and cell cycle perturbation. In: Reviews in Food and Nutrition Toxicity. Preedy VR, Watson R. 4th ed. London: CRC Press; 2005; p. 213-31.
5. Park DL. Effect of processing on aflatoxin. *Adv Exp Med Biol* 2002; 504: 173-9.
6. Codex Alimentarius Commissions. Comments submitted on the draft maximum level for Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk. Codex committee on food additives and cotaminants. 33rd sessions, Hauge, The Netherlands. 2001. Available from: [http://www.ecolomics-international.org/cad\_codex\_alimentarius\_evaluation\_report\_2002.htm]
7. Rastogi S, Dwivedi DP, Khanna KS, Das M. Detection of aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. *Food Control* 2004; 15: 287-90.
8. Kamkar A. A study on the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control* 2005; 16: 593-9.
9. Bakirci I. A study on the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food control* 2001; 12: 47-51.
10. Kamkar A. A study on the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in Iranian Feta cheese. *Food Control* 2005; 16: 257-61.
11. Roussi V, Govaris A, varagouli A, Botsoglou NA. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw and market milk commercialized in Greece. *Food Addit Contam* 2002; 19: 863-68.
12. Rodriguez ML, Velasco MM, Calonge D, Ordonez Escudero D. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk. *Food Addit Contam* 2003; 20: 276-80.
13. Srivastava VP, Bu-Abbas A, Alaa-Basuny W, Al-Johar W, Al-Mufi S, Siddiqui MK. Aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in commercial samples of milk and dairy products in Kuwait. *Food Addit Contam* 2001; 18: 993-7.
14. Martins ML, Martins HM. Aflatoxin M<sub>1</sub> in yoghurts in Portugal. *Int J Food Microbiol* 2004; 91: 315-7.
15. Manetta AC, Giuseppe LD, Giammarco M, Fusaro I, Simonella A, Gramenzi A, et al. High-performance liquid chromatography with post-column dramatization and fluorescence detection for sensitive determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and cheese. *J Chromatogr* 2005; 1083: 219-22.
16. 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: 263-6.
17. Yaroglu T, Oruc HH, Tayar M. Aflatoxin M<sub>1</sub> levels in cheese samples from some provinces of Turkey. *Food Control* 2005; 16: 883-5.
18. Van Egmond HP. Aflatoxin M<sub>1</sub>. Occurrence, toxicity, regulation. In: Van Egmond HP, editor. Mycotoxins in dairy products. London and New York: Elsevier Applied Science; 1989; p. 11-55.
19. Rothschild LJ. IARC classes AFB<sub>1</sub> as class 1 human carcinogen. *Food Chemistry* 1992; 34: 62-6.
20. Markaki P, Melissari E. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in commercial Pasteurized milk determined with ELISA and HPLC. *Food Addit Contam* 2004; 21: 592-7.
21. Panariti E. Seasonal variations of aflatoxin M<sub>1</sub> in the farm milk in Albania. *Arh Hig Rada Toksikol* 2001; 52: 37-41.
22. Gürbay A, Aydın S, Girgin G, Engin AB, Şahin G. Assessment of aflatoxin M<sub>1</sub> levels in milk in Ankara, Turkey. *Food Control* 2006; 17: 1-4.
23. Alborzi S, pourabbas B, Rashidi M, Astaneh B. Aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in pasteurized milk in Shiraz (south of Iran). *Food Control* 2006; 17: 582-4.
24. Kim EK, Shon DH, Ryu D, Park JW, Hwang HJ Kim YB. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. *Food Additive and Contaminants* 2000; 17: 59-64.
25. Van Egmond HP. Rationale for regulating programmes for mycotoxins in human foods and animal feeds. *Food Additives and contaminants*. 1993; 10:29-36.
26. Nakajima M, Tabata S, Akiyama H, Itoh Y, Tanaka T, Sunagawa H, Tyonan T, Yoshizawa T, Kumagai S. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in domestic milk Japan during the winter season. *Food Addit Contam* 2004; 21: 472-8.
27. Galvano F, Glofaro V, Ritieni A, Bognanno M, De Angelis A, Galvano G. Survey of the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products marketed in Italy: second year of observation. *Food Addit Contam* 2001; 18: 644-6.
28. Sassahara M, Pontes Netto D, Yanaka, EK. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk in the North of Parana state. *Food Chem Toxicol* 2005; 43: 981-4.
29. Elgerbi, AM, Aidoo KE, Candlish AA, Tester RT. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in randomly selected North African milk and cheese samples. *Food Addit Contam* 2004; 21: 592-7.
30. Fukal L, Brezina P. Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> level in milk in the production of baby and children's food using immunoassay. *Nahrung* 1991; 35: 745-8.
31. Martins ML, Martins HM. Aflatoxin M<sub>1</sub> in raw and ultra high temperature-treated milk commercialized in Portugal. *Food Addit Contam* 2000; 17: 871-4.

## Aflatoxin M<sub>1</sub> level in pasteurized and sterilized milk of Babol city

Gholampour Azizi I.<sup>1</sup>  
Khoushnevis S H.<sup>2</sup>  
Hashemi S J.<sup>3\*</sup>

1- Department of Mycology

2- Department of Nursing

Islamic Azad University Babol  
branch

3- Department of mycology,  
Tehran University of Medical  
Sciences

### Abstract

**Background:** Aflatoxins are severe toxic secondary metabolites found in most plant products. When animals consume contaminated feed stuff to Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), the toxin is metabolized by liver and is excreted as Aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) via milk. Aflatoxins are acute toxic compounds, immunosuppressive, mutagen, teratogen and carcinogen.

**Methods:** During the winter of 2006, pasteurized and sterilized (ultra high temperature) (UHT) milk packages were collected from supermarkets in Babol city. 78 pasteurized and 33 sterilized milk, totally 111 samples were tested for AFM<sub>1</sub> by competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Solid phase in plastic micro wells coated with anti-Aflatoxin M<sub>1</sub> antibodies. We added 100 microliter skimmed milk and Aflatoxin M<sub>1</sub> standard solutions in each well. In each plate, we appointed seven wells for standards. Plates were incubated at 20-25° centigrade for 45 min. Each well was washed four times by washing buffer 20X concentration. Then 100 micro liter conjugated solution (100X) was added to each well, and the plate was incubated at 20-25 centigrade for 15 min. After that, the wells were washed. After adding the substrates to wells, we incubated the plate at 20-25° centigrade in a dark place for 15 min. The reaction was stopped by stop solution. After one hour, light absorption was read at 450 nm by ELISA reader.

**Results:** AFM<sub>1</sub> were detected in 100% of all samples. 100% of samples were above of European community regulations (50ng/l). AFM<sub>1</sub> contamination mean levels pasteurized and sterilized milk were 230.5 and 221.66 respectively. Therefore more than four fold levels European community. There is not a significant relationship between AFM<sub>1</sub> contamination level and different months of winter applying statistical test.

**Conclusion:** The results showed the need for introducing safety limits for AFM<sub>1</sub> levels in child milk under Food Legislative liable of Iran. Aflatoxin M<sub>1</sub> contamination is a serious problem for public health, and it is potentially hazardous for human health.

**Keywords:** Aflatoxin M<sub>1</sub>, ELISA, milk.

\* Corresponding author: P.O.Box:  
14155-6446 Medical Mycology Dep.  
School of Public Health, Tehran  
University of Medical sciences, Tehran  
Tel: +98-21-88951583  
email: sjhashemi@tums.ac.ir