

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE



SRĐAN M. STEFANOVIĆ

UPOREDNO ISPITIVANJE PRISUSTVA
AFLATOKSINA B₁ U HRANI ZA
ŽIVOTINJE I AFLATOKSINA M₁ U MLEKU

Doktorska disertacija

Beograd, 2014.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**



SRĐAN M. STEFANOVIĆ

**COMPARATIVE INVESTIGATION OF
AFLATOXIN B₁ PRESENCE IN FEED AND
AFLATOXIN M₁ PRESENCE IN MILK**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2014.

Mentor:

dr Jelena Nedeljković Trailović

Vanredni profesor

Fakultet Veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Katedra za ishranu

Članovi Komisije:

dr Vera Katić

Redovni profesor

Fakultet Veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Katedra za higijenu i tehnologiju mleka

dr Dragan Milićević

Viši naučni saradnik

Institut za higijenu i tehnologiju mesa

Beograd

datum odbrane doktorske disertacije

Zahvalnica

Zahvaljujem se mom mentoru, prof. dr Jeleni Nedeljković – Trailović na ukazanom poverenju i časti da budem njen doktorand, kao i na prenetom znanju i nesebičnoj pomoći pruženoj pri osmišljavanju i izradi ove disertacije.

Zahvaljujem članovima komisije, prof. dr Veri Katić i dr Draganu Milićeviću na dobronamernim sugestijama i pomoći koju su mi pružili tokom rada.

Zahvaljujem se svojoj matičnoj kući, Institutu za higijenu i tehnologiju mesa u Beogradu na pruženoj pomoći u obezbeđenju organizacije i finansiranja eksperimentalnog dela ove disertacije.

Zahvaljujem se svim svojim koleginicama i kolegama, na nesebičnoj pomoći i iskrenoj podršci koju su mi pružali pri izradi ove disertacije.

Naročitu zahvalnost dugujem kolegici Danki Spirić i njenim saradnicima, koji su sa velikom energijom sprovedli ispitivanja aflatoksina B_1 u kukuruzu i aflatoksina M_1 u mleku ELISA metodom, kao i kolegi dr Radivoju Petronijeviću na nesebičnoj pomoći pri zahtevnoj statističkoj obradi rezultata.

Za Miću

UPOREDNO ISPITIVANJE PRISUSTVA AFLATOKSINA B₁ U HRANI ZA ŽIVOTINJE I AFLATOKSINA M₁ U MLEKU

Rezime: Cilj ove disertacije je bio da se ispita zastupljenost i tok kontaminacije kukuruza aflatoksinom B₁ (AfB₁), kao i obim i tok posledičnog nalaza njegovog metabolita aflatoksina M₁ (AfM₁) u mleku, nakon ekstremne suše koja je u leto 2012. godine pogodila jugoistočnu Evropu i Balkansko poluostrvo, uključujući i Republiku Srbiju. Takođe, cilj disertacije je bio i da se razviju i validuju savremene analitičke metode tačne hromatografije ultra visokih performansi kuplovane sa masenom detekcijom (UPLC-MS/MS) za određivanje sadržaja AfB₁ i AfM₁ radi poboljšanja analitičkih kapaciteta laboratorija za ispitivanje bezbednosti hrane i hrane za životinje i posledičnog očuvanja zdravlja ljudi i životinja.

Uzorkovanje kukuruza i mleka sprovedeno je na gotovo celoj teritoriji Republike Srbije bez AP Kosovo i Metohija. U cilju adekvatnog sistematizovanja rezultata, teritorija Republike Srbije je arbitrarno podeljena na tri regije: vojvođansku regiju, beogradsku regiju i centralnu Srbiju. Uzorkovanje kukuruza sprovedeno je tokom novembra 2012. i marta 2013. godine na teritorijama 23 upravna okruga Republike sa farmi mlečnih krava, iz silosa i od individualnih proizvođača hrane za životinje. Ukupno je uzorkovano 680 uzoraka kukuruza namenjenog za pripremu hrane za životinje. Uzorkovanje sirovog i termički obrađenog mleka je sprovedeno kontinualno od februara 2013. godine do polovine juna 2013. godine na teritorijama 24 upravna okruga Republike sa farmi mlečnih krava, iz mlekara, od individualnih proizvođača i iz prometa. Ukupno je uzorkovano 6.625 uzoraka mleka. Uzorkovanje je sprovedeno na način da se obezbedi adekvatna reprezentativnost u pogledu homogenosti uzorka i sadržaja AfB₁ i AfM₁.

Uzorci kukuruza i mleka su analizirani na sadržaj AfB₁ i AfM₁ korišćenjem imunoenzimskih (ELISA) metoda. Odabrano je 100 uzoraka kukuruza i 250 uzoraka mleka koji su paralelno analizirani razvijenim i validovanim UPLC-MS/MS metodama sa ciljem poređenja dve analitičke tehnike.

Rezultati ispitivanja su potvrdili visoku kontaminaciju kukuruza sa AfB₁, kao i prisustvo AfM₁ u velikom broju ispitivanih uzoraka mleka. Prosečan broj uzoraka kukuruza na nivou Republike Srbije sa sadržajem AfB₁ većim od nacionalne MDK vrednosti od 50 µg/kg iznosio je 24,3%, a ovaj procenat je značajno veći i iznosi 37,8%, ukoliko se u obzir uzme MDK vrednost važeća u EU od 20 µg/kg. Najviša koncentracija AfB₁ je pronađena u jednom uzorku sa teritorije centralne Srbije i iznosila je 560 µg/kg. Najviša kontaminacija zabeležena je na području vojvođanske regije, nešto niža na području beogradske regije a najniža na području centralne Srbije. Statistički značajnih razlika u stepenu kontaminacije ima jedino između vojvođanske regije i centralne Srbije dok između vojvođanske i beogradske regije nisu zabeležene statistički značajne razlike u kontaminaciji kukuruza sa AfB₁. Promena koncentracije AfB₁ u vremenu analizirana je poređenjem koncentracija u uzorcima uzorkovanih u dva perioda u sve tri regije kao i na nivou cele Republike. Zabeležen je jasan trend rasta sadržaja AfB₁ u svim regijama pojedinačno i zbirno, usled u literaturi dobro opisane pojave sekundarne kontaminacije kukuruza tokom njegovog skladištenja.

Prosečan broj uzoraka mleka na nivou Republike Srbije sa sadržajem AfM₁ većim od trenutno važeće nacionalne MDK vrednosti od 0,5 µg/kg iznosio je 6,23 %. Međutim, ovaj procenat je drastično veći i iznosi 68,43 % ukoliko se u obzir uzme MDK vrednost važeća u EU od 0,05 µg/kg. Najviša koncentracija AfM₁ je pronađena u jednom uzorku sa teritorije beogradske regije i iznosila je 1,778 µg/kg. Kao i u slučaju AfB₁ u kukuruzu, najviše prisustvo rezidua AfM₁ zabeleženo je na području vojvođanske regije, nešto niže na području beogradske regije a najniže na području centralne Srbije. Za razliku od sadržaja AfB₁ u kukuruzu, razlike u sadržaju AfM₁ u svim regijama su statistički veoma značajne (p<0,0001). Promena koncentracije AfM₁ u vremenu analizirana je poređenjem koncentracija u

uzorcima uzorkovanih u tri perioda u sve tri regije kao i na nivou cele Republike. Zabeležen je jasan trend rasta sadržaja AfM₁ u svim regijama što odgovara rezultatima koji se odnose na AfB₁ u kukuruzu. Međutim, trend rasta koncentracija AfM₁ je blaži u svim regijama u odnosu na rast AfB₁ u kukuruzu, što se može objasniti nizom mera koje su se tokom perioda ispitivanja preduzimale od strane regulatornih tela i činilaca u lancu proizvodnje i prerade mleka sa ciljem smanjenja sadržaja AfM₁.

Validacije UPLC-MS/MS metoda za određivanje AfB₁ u kukuruzu i AfM₁ u mleku, pokazale su vrednosti parametara koji su u skladu sa zahtevima regulative EU koja se odnosi na performanse analitičkih metoda. Poređenje ELISA i UPLC-MS/MS metoda za određivanje sadržaja AfB₁ u kukuruzu i AfM₁ u mleku, pokazalo je visok stepen slaganja dobijenih rezultata. Koeficijenti determinacije (r^2) dobijeni paralelnim izvođenjem ELISA i UPLC-MS/MS metoda za određivanje sadržaja AfB₁ u kukuruzu i AfM₁ u mleku iznosili su 0,994 i 0,920.

Ključne reči: aflatoksin B1, aflatoksin M1, klimatske promene, kontaminacija, kukuruz, mleko, Srbija, UPLC-MS/MS

Naučna oblast: Veterinarstvo

Uža naučna oblast: Bezbednost hrane

UDK broj: 366.624.4+615.334:636.087+613.287.5

COMPARATIVE INVESTIGATION OF AFLATOXIN B₁ PRESENCE IN FEED AND AFLATOXIN M₁ PRESENCE IN MILK

Summary: The aim of this doctoral dissertation is to investigate magnitude and course of maize contamination with aflatoxin B₁ (AfB₁), as well as magnitude and course of the findings of its metabolite - aflatoxin M₁ (AfM₁) in milk, after extreme drought that affected south-eastern Europe and Balkans, including the Republic of Serbia, in summer 2012. Furthermore, the aim of this work was also to perform validation of state-of-the-art analytical methods based on ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), for determination of AfB₁ and AfM₁ for the purpose of improving analytical capacities of Serbian food and feed safety laboratories and consequent health preservation of animals and humans.

Sampling of maize and milk was performed on almost entire territory of the Republic of Serbia (excluding Autonomous Province of Kosovo and Metohija). In order to enable systematic presentation of the results, territory of the Republic of Serbia was arbitrary divided into three regions: Vojvodina region, Belgrade region and central Serbia. Maize sampling was conducted during November of 2012 and March of 2013 on the territories of 23 Counties of the country. Samples were taken from dairy farms, siloses and from individual manufacturers of feed intended for dairy cattle. Total of 680 samples of maize intended for feed production were taken. Sampling of raw and thermically treated milk was conducted continually from February 2013 to mid-June 2013 in 24 Counties of the country. Samples were taken from dairy farms, dairies, from individual farmers and from retail. Total of 6,625 milk samples were taken for the analysis. Sampling was conducted in a way to ensure sample homogeneity in respect to AfB₁ and AfM₁.

Maize and milk samples were analysed for the AfB₁ and AfM₁ content using immune-assays (ELISA). Total of 100 maize samples and 250 milk samples were

selected and analysed simultaneously using ELISA and validated UPLC-MS/MS methods in order to compare two different analytical techniques.

Investigation results confirmed high-level contamination of maize with AFB₁, as well as the presence of AfM₁ in large number of milk samples. Average number of positive maize samples that were non-compliant according to national MRL (50 µg/kg) was 24.3%. This number is significantly higher if EU MRL of 20 µg/kg is taken into account, amounting to 37.8%. The highest concentration of AFB₁ was found in one sample taken from central Serbia - 560 µg/kg. The highest contamination was recorded on the territory of Vojvodina region, followed by Belgrade region and Central Serbia. Statistically significant differences between degrees of contamination among three regions was found only between Vojvodina region and central Serbia, while differences between Vojvodina and Belgrade regions were not significant regarding AFB₁ contamination of maize. Variations of AFB₁ concentrations in time were analysed by comparison of concentrations in samples taken in two sampling periods in all three regions. Trend of AFB₁ concentrations increase was clear in all three regions, due to the well described secondary contamination of maize during storage.

Average percentage of milk samples that were non-compliant according to current national MRL of 0.5 µg/kg was 6.23 %. However, this number is significantly higher if EU MRL value (0,05 µg/kg) is taken into account – 68.43 %. The highest concentration of AfM₁ was found in one sample taken from the Belgrade region (1.778 µg/kg). Similar to AFB₁ in maize, the highest presence of AfM₁ residues was recorded in Vojvodina region, followed by Belgrade region and central Serbia. However, unlike the AFB₁ in maize, differences in AfM₁ content are statistically significant among all three regions ($p < 0,0001$). Variations in AfM₁ concentrations in time were analyzed by comparison of milk samples taken during three investigation periods in all three regions separately, and at the level of the entire country. Trend of increase of AfM₁ content in milk samples was observed in all regions which corresponds to the results of maize samples. However, this increasing trend is less steep in the case of milk samples which can be explained by

number of measures taken in the meantime by competent authorities and all interested parties in milk production and processing, in order to decrease AfM₁ content.

Validations of UPLC-MS/MS methods for determination of AfB₁ in maize and AfM₁ in milk, demonstrated the fitness-for-purpose of these analytical methods in respect to parameters set by EU regulations concerning performances of analytical methods. Comparison of ELISA and UPLC-MS/MS methods for determination of AfB₁ content in maize and AfM₁ content in milk, demonstrated high degree of concurrence between obtained results. Coefficient of determination (r^2) for comparison of AfB₁ and AfM₁ methods were 0.994 and 0.920 respectively.

Key words: aflatoxin B₁, aflatoxin M₁, climate changes, contamination maize, milk, Serbia, UPLC-MS/MS

Scientific field: Veterinary medicine

Specific scientific field: Food safety

UDC: 366.624.4+615.334:636.087+613.287.5

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Pregled literature	4
2.1 Aflatoksini – opšti podaci	4
2.2 Struktura i opšte osobine aflatoksina B ₁	8
2.3 Metabolizam aflatoksina B ₁	9
2.4 Toksičnost aflatoksina B ₁	12
2.5 Opšte osobine, metabolizam i toksičnost aflatoksina M ₁	17
2.6 Infestacija kukuruza plesnima roda <i>Aspergillus</i>	22
2.7 Klimatske promene - uticaj na kontaminaciju kukuruza aflatoksinom B ₁	26
2.8 Pregled studija o kontaminaciji aflatoksinom B ₁ u pojedinim zemljama	32
2.9 Pregled studija o kontaminaciji aflatoksinom M ₁ u pojedinim zemljama	34
2.10 Zakonska regulativa koja se odnosi na aflatoksin B ₁ u hrani za životinje i aflatoksin M ₁ u mleku	37
2.11 Analitičke metode za određivanje aflatoksina B ₁ i aflatoksina M ₁	42
3. Cilj i zadatak	51
4. Materijal i metode	53
4.1 Uzorkovanje kukuruza i mleka	53
4.2 ELISA metoda za određivanje aflatoksina B ₁ u kukuruзу	59
4.3 ELISA metoda za određivanje aflatoksina M ₁ u mleku	60
4.4 UPLC-MS/MS metoda za određivanje aflatoksina B ₁ u kukuruзу	62
4.5 UPLC-MS/MS metoda za određivanje aflatoksina M ₁ u mleku	64
4.6 Validacija UPLC-MS/MS metoda za određivanje aflatoksina B ₁ u kukuruзу i aflatoksina M ₁ u mleku	66
4.7 Statistička obrada rezultata	68
5. Rezultati	70
5.1 Aflatoksin B ₁ u kukuruзу	71
5.1.1 Pregled broja analiziranih uzoraka po regijama i periodima	71
5.1.2 Sadržaj aflatoksina B ₁ u regijama	73
5.1.3 Distribucija aflatoksina B ₁ kroz regije	77
5.1.4 Značajnost razlika u sadržaju aflatoksina B ₁	81
5.1.5 Promena sadržaja aflatoksina B ₁ tokom vremena	83
5.2 Aflatoksin M ₁ u mleku	86
5.2.1 Pregled broja analiziranih uzoraka po regijama i periodima	86
5.2.2 Sadržaj aflatoksina M ₁ u regijama	88
5.2.3 Distribucija aflatoksina M ₁ kroz regije	91
5.2.4 Značajnosti razlika u sadržaju aflatoksina M ₁	94

5.2.5 Promena sadržaja aflatoksina M ₁ tokom vremena	97
5.3 Validacija UPLC-MS/MS metoda za određivanje sadržaja aflatoksina B ₁ u kukuruzu i aflatoksina M ₁ u mleku - poređenje ELISA i UPLC-MS/MS metoda	100
5.3.1 Validacija UPLC-MS/MS metode za određivanje aflatoksina B ₁ u kukuruzu	100
5.3.2 Poređenje ELISA i UPLC-MS/MS metode za određivanje aflatoksina B ₁ u kukuruzu	103
5.3.3 Validacija UPLC-MS/MS metode za određivanje aflatoksina M ₁ u mleku	104
5.3.4 Poređenje ELISA i UPLC-MS/MS metode za određivanje aflatoksina M ₁ u mleku	107
6. Diskusija	109
6.1 Aflatoksin B ₁ u kukuruzu	109
6.1.1 Sadržaj aflatoksina B ₁ po regijama	111
6.1.2 Distribucija aflatoksina B ₁ kroz regije	113
6.1.3 Promena sadržaja aflatoksina B ₁ tokom vremena	115
6.2 Aflatoksin M ₁ u mleku	116
6.2.1 Sadržaj aflatoksina M ₁ po regijama	117
6.2.2 Distribucija aflatoksina M ₁ kroz regije	120
6.2.3 Promena sadržaja aflatoksina M ₁ tokom vremena	121
6.3 Validacija UPLC-MS/MS metoda za određivanje aflatoksina B ₁ u kukuruzu i aflatoksina M ₁ u mleku i poređenje sa ELISA metodama	123
6.3.1 Validacija UPLC-MS/MS metoda za određivanje sadržaja aflatoksina B ₁ u kukuruzu i aflatoksina M ₁ u mleku	125
6.3.2 Poređenje ELISA i UPLC-MS/MS metoda za određivanje aflatoksina B ₁ i aflatoksina M ₁	127
7. Zaključci	129
8. Literatura	131
9. Prilog	
10. Biografija	
11. Izjava o autorstvu	
12. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	
13. Izjava o korišćenju	

1. UVOD

Mikotoksini su toksični produkti sekundarnog metabolizma pretežno saprofitskih plesni, koji u organizam ljudi i životinja dospevaju putem kontaminirane hrane. Mikotoksikoze, tj. intoksikacije mikotoksinima su gotovo uvek vezane za alimentarni put unošenja, nisu infektivne i etiološki su isključivo vezane za toksin-produkujuće sojeve plesni. Zahvaljujući velikom interesovanju za ova jedinjenja, kao i brzom razvoju modernih analitičkih tehnika u poslednjih nekoliko decenija, danas je poznata struktura preko 300 mikotoksina. Štete koje nastaju kao posledica unošenja mikotoksina u organizam ljudi i životinja su višestruke, po prostornom zahvatu su globalne i obuhvataju sve elemente lanca hrane, od proizvodnje hrane i hrane za životinje do zdravlja ljudi i životinja.

Prema podacima FAO (2005), kontaminacija žitarica mikotoksinima na svetskom nivou iznosi oko 30% što dovoljno govori o značaju problema pojave mikotoksina u lancu ishrane, i o potrebi nalaženja novih rešenja za smanjivanje kontaminacije hrane ovim jedinjenjima. Iako je broj otkrivenih mikotoksina veliki, brojnim istraživanjima utvrđeno je da samo 20-30 prema svojoj toksičnosti i zastupljenosti imaju medicinski, nutritivni ekološki i ekonomski značaj (Wild i sar, 2010). Jedna od najznačajnijih grupa mikotoksina su svakako aflatoksini (Af). To su jedinjenja bis-furokumarinske strukture koja proizvode različite vrste plesni iz roda *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*...). Ova grupa srodnih jedinjenja je široko rasprostranjena u prirodi. Do sada je otkriveno 17 aflatoksina, a najznačajniji predstavnik ove grupe, kako sa aspekta prevalencije, tako i toksičnosti, je aflatoksin B₁ (AfB₁), za koji je utvrđeno da poseduje niz bioloških aktivnosti

uključujući akutnu toksičnost, teratogenost, mutagenost i karcinogenost (McLean i Dutton, 1995). Jedan od najvažnijih predstavnika metabolita AfB₁ je aflatoxin M₁ (AfM₁), njegov hidroksi derivat koji se izlučuje mlekom i poseduje analogne toksikološke karakteristike u odnosu na AfB₁. Do 2002. godine se smatralo da ovaj metabolit ima manji karcinogeni potencijal od AfB₁. Međutim, Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) je 2002. godine sve prirodno sintetisane aflatoksine klasifikovala u grupu 1 – dokazani karcinogeni agens (IARC, 2002).

Poznato je da su kikiriki, kukuruz, ječam i ostala zrnasta hraniva veoma podložni infestaciji plesnima koje proizvode toksine roda *Aspergillus*, kao i da se u njima često nalaze značajne koncentracije AfB₁.

Ekstremni klimatski uslovi, u sadejstvu sa ostalim faktorima, pogodovali su razvoju aflatoksikogenih plesni, prvenstveno na kulturama kukuruza, i pojavi povećanog sadržaja AfB₁ u kukuruzu širom Republike Srbije nakon žetve 2012. godine, a posledično i povećanom sadržaju AfM₁ u mleku. Pojava AfB₁ i AfM₁ u kukuruzu i mleku izazvala je veliku pažnju naučne, stručne i ostale javnosti u našoj zemlji.

Imajući u vidu globalni značaj prisustva AfB₁ u hrani i hrani za životinje, kao i rezidua AfM₁ u mleku, kako sa aspekta bezbednosti hrane i hrane za životinje, tako i sa aspekta globalne trgovine, u velikom broju zemalja je na snazi zakonska regulativa koja postavlja maksimalno dozvoljene količine (MDK) za AfB₁ u kukuruzu i AfM₁ u mleku.

Zakonima propisane maksimalno dozvoljene količine za AfB₁ i AfM₁ nameću i potrebu za efikasnom laboratorijskom kontrolom prisustva ovih jedinjenja u hrani, hrani za životinje i mleku. Neadekvatne analitičke metode i posledična pojava lažno pozitivnih i/ili lažno negativnih rezultata može dovesti do nemerljivih šteta kako po zdravlje ljudi i životinja, tako i po nacionalne i međunarodne trgovinske tokove.

Stoga je implementacija adekvatne analitičke metodologije, kako u naučne, tako i u regulatorne svrhe od primarnog značaja pri utvrđivanju stepena kontaminacije hrane i krane za životinje sa AfB₁, kao i utvrđivanju sadržaja rezidua AfM₁ u mleku.

2. PREGLED LITERATURE

Uzimajući u obzir kompleksnost problematike mikotoksina i mikotoksikoza, odnosno različite aspekte sa kojih se mogu razmatrati pitanja vezana za uticaj ovih kontaminanata i rezidua na zdravlje i produktivnost životinja, u pregledu literature navedeni su samo radovi koji se odnose na predmet istraživanja i određivane parametre. Zbog bolje preglednosti, materija je podeljena prema elementima istraživanja.

2.1 Aflatoksini – opšti podaci

Aflatoksini predstavljaju grupu hemijski srodnih mikotoksina, sekundarnih metabolita toksikogenih plesni roda *Aspergillus*. Ovi organizmi su ubikvitarni i pretežno se nalaze na hrani i hrani za životinje, razmnožavajući se na poljima ili tokom njenog skladištenja. Sintetišu ih uglavnom micelijumske strukture plesni. Ova jedinjenja ne igraju nikakvu ulogu u sopstvenom metabolizmu rasti i razvoju plesni (Moss, 1991) – te otuda i naziv “sekundarni”. Sa druge strane, Schardi i sar, 1996 prisustvo ovih jedinjenja tumače i kroz prizmu zaštite infestirane biljke s obzirom da neki mikotoksini sprečavaju naseljavanje biljnim parazitima. Pored ove, postoji i niz drugih teorija o razlozima za proizvodnju mikotoksina od strane plesni, ali ni jedna od njih do sada nije naučno potvrđena. Neki autori produkciju aflatoksina pripisuju odgovoru plesni na uslove spoljašnje sredine i stres dok neki govore o sintezi kao načinu zaštite od ultraljubičastog zračenja iz spektra sunčeve svetlosti (Cary i Ehrlich, 2006). Pojedini autori potvrđuju teorije Shardijske i sar.

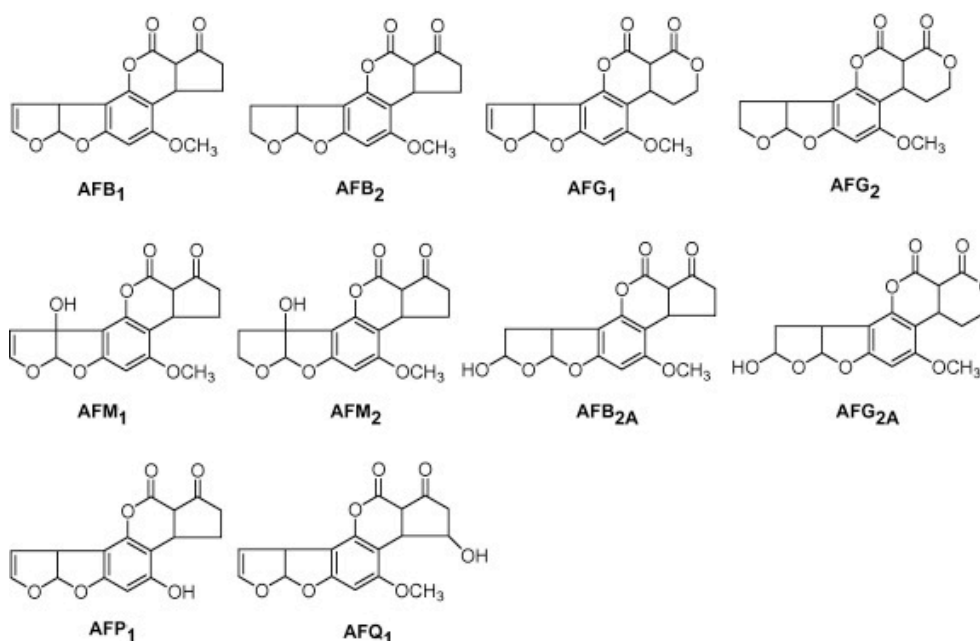
(1996), i sintezu mikotoksina pripisuju odbrambenom mehanizmu plesni od predatora i ugrožavanja njihovih reproduktivnih organa (Magan i Aldred, 2007). Međutim, uneti u organizam životinja ili čoveka, ovi molekuli ispoljavaju niz bioloških aktivnosti, uključujući akutnu i hroničnu toksičnost, teratogenost, mutagenost i karcinogenost (McLean i Dutton, 1995). Zato su ova jedinjenja svrstana u grupu najznačajnijih mikotoksina. Njihovo prisustvo u organizmu životinja i primarnim proizvodima animalnog porekla uzrokuje direktne i indirektne štete koje se ogledaju u narušavanju zdravlja, padu produktivnosti i posledično velikim ekonomskim gubicima. Štetno dejstvo mikotoksina, pa i aflatoksina poznato je od davnina. Trovanja ljudi i životinja toksinima ražane glavice prvi put su opisana još u X veku pod imenom "vatra Sv. Antonija" (Smith i Moss, 1985, Berry, 1998). Danas se smatra da su ova trovanja (radi se o ergot alkaloidima) sa svojom upečatljivom kliničkom slikom nekrotičnih promena na koži i sluzokožama, kao i konvulzijama, bila povod za čuvena i istorijski dobro dokumentovana suđenja „vešticama” u mestu Salem u Masačusetsu, današnje Sjedinjene Države, krajem XVII veka (Richard, 2007). U Japanu je 1891. godine prvi put dokazano da je plesnjivi neglazirani pirinač smrtonosan za eksperimentalne životinje. Miake i sar. su 1920. godine prvi izolovali plesan sa žućkasto obojenog pirinča i identifikovali je kao *Penicillium citreonigrum* (Saito i sar, 1971). Toksični proizvod ove plesni je u to vreme bio nazvan citreoviridin. U posleratnom periodu, Japan je bio prinuđen da uvozi pirinač zbog čestih slučajeva trovanja kontaminiranim pirinčem. Ova oboljenja su nazvana "sindrom žutog pirinča". Danas je poznato da su za njih odgovorne dve vrste plesni: *P. islandicum* koji izaziva braonkasto prebojenje pirinča i luči luteoskirin i cikloohlorotin, i *P. citrinum* koji dovodi do žućkastog prebojenja i luči citrinin (Udagawa i sar, 2000).

Tokom perioda 1940-1950 zabeležene su pojave nekoliko incidenata sa smrtnim ishodom većeg broja ljudi u Rusiji. U to vreme, bolest je nazvana "alimentarna toksična aleukija – ATA". Drastični simptomi ove bolesti sastojali su se od nekrotičnih i hemoragičnih promena kao i manifestacijama na centralnom

nervnom sistemu. Bolest je pripisana ishrani plesnjivim žitaricama (Richard, 2007). Naravno, u to vreme nije moglo biti govora o identifikaciji toksičnog agensa, ali se iz današnje vizure poznavanja vrsta plesni i dejstava mikotoksina sa sigurnošću može zaključiti da se radilo o T-2 toksinu, produktu *Fusarium spp.*

Dvadeseti vek donosi konkretna saznanja o mikotoksikozama. Značaj aflatoksina je prvi put sagledan 1960. godine, nakon masovnog uginuća ćurica, pačića i pilića (više od 100 000 jedinki) u Velikoj Britaniji. U to vreme, hemijska struktura, niti uloga aflatoksina još nije bila poznata, te je ova "misteriozna" bolest nazvana "X - oboljenje ćuraka" ili hepatična nekroza (Asao, et al, 1963; Butler, 1974). Miološka analiza hrane za životinje kojom je uginula živina hranjena, potvrdila je prisustvo plesni *Aspergillus flavus*. Kasnija analiza hromatografijom na tankom sloju omogućila je isprva samo vizualnu identifikaciju nekoliko jedinjenja koja su pokazala sposobnost native fluorescencije nakon izlaganja ultraljubičastom svetlu. Ova jedinjenja su nazvana aflatoksini ("**A. flavus toksin**") a tadašnje otkriće postaje prekretnica u daljem izučavanju mikotoksina i mikotoksikoza uopšte.

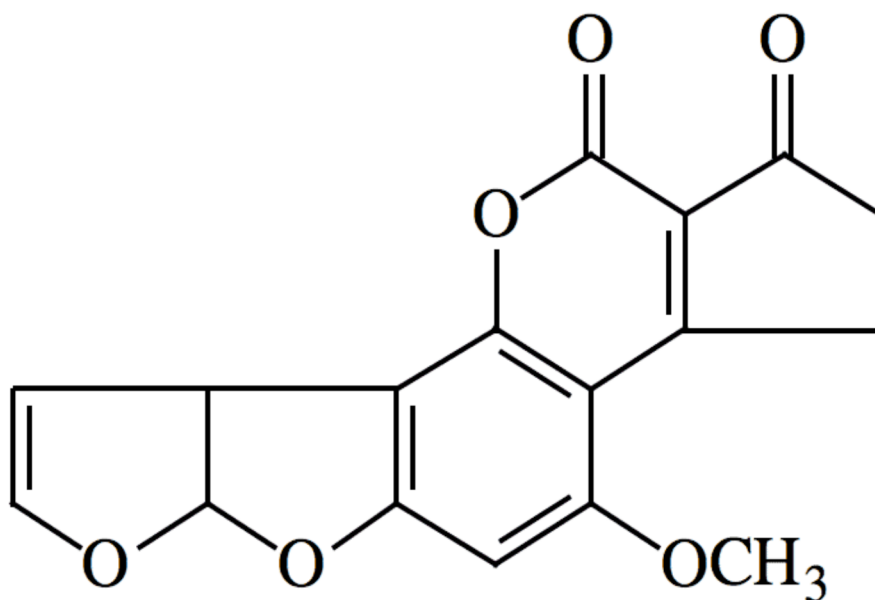
Iako je prema literaturnim podacima (McLean i Dutton, 1995) u ranijem periodu bilo izolovano 17 jedinjenja koja se prema hemijskoj strukturi svrstavaju u aflatoksine, taj broj nije konačan; drugi autori prijavljuju preko 20 jedinjenja (Hussein i Brasel, 2001). Ipak, ovaj termin se u praktičnom kontekstu prevashodno odnosi na četiri jedinjenja koje proizvode plesni *A. flavus* i *A. parasiticus* – aflatoksin B₁ (AfB₁), aflatoksin B₂ (AfB₂), aflatoksin G₁ (AfG₁) i aflatoksin G₂ (AfG₂), kao i na najznačajniji metabolit AfB₁ koji se izlučuje mlekom, aflatoksin M₁ (AfM₁). Na osnovu hemijske strukture, ova jedinjenja predstavljaju dihidro ili tetrahidrofuranske grupe vezane za kumarinski prsten. Slika 1 prikazuje hemijsku strukturu aflatoksina i njihovih značajnijih metabolita.



Slika 1. Hemijska struktura aflatoksina i njihovih značajnijih metabolita

Aspergillus flavus proizvodi AfB₁ i AfB₂ dok je *Aspergillus parasiticus* odgovoran za produkciju sva četiri aflatoksina (B₁, B₂, G₁ i G₂) (D' Mello i MacDonald, 1997). Kao i ostala heterociklična jedinjenja, i aflatoksini imaju sposobnost native fluorescencije (Sargeant i sar, 1963), te poreklo njihovih oznaka vodi iz ove činjenice. Naime, AfB₁ i AfB₂ emituju plavu svetlost kada su sami osvetljeni ultraljubičastom svetlošću talasne dužine od 366 nm (engl. blue = plavo) dok AfG₁ i AfG₂ fluoresciraju žuto-zelenom svetlošću (engl. green = zeleno). Ovakve fizičko-hemijske osobine su ujedno bile i osnova za razvoj većeg broja metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje sadržaja aflatoksina u hrani i hrani za životinje.

2.2 Struktura i opšte osobine aflatoksina B₁



Slika 2. Hemijska struktura AfB₁

Izolovani aflatoksin B₁ je belo-žuti prah slabo rastvorljiv u vodi, dok se u većini organskih rastvarača umerene polarnosti kao što su hloroform i metanol dobro rastvara, a naročito je rastvorljiv u dimetil sulfoksidu. Ovaj mikotoksin je po svojoj hemijskoj strukturi bisfurokumarin molekulske mase 312 i zbirne formule C₁₇H₁₂O₆. Slika 2 prikazuje hemijsku strukturu AfB₁. Svi aflatoksini su izuzetno termostabilni i tokom uobičajene termičke obrade hrane (kuvanje, pasterizacija) se malo ili uopšte ne razaraju (McLean i Dutton, 1995), što je od velikog značaja sa aspekta prevencije kontaminacije hrane i hrane za životinje.

2.3 Metabolizam aflatoksina B₁

Sve do danas postoji mnogo praznina u fundamentalnom razumevanju koordinisane regulacije formiranja aflatoksina, interakcije između primarnog i sekundarnog metabolizma plesni, kao i biotičkih i abiotičkih faktora koji rezultiraju određenom produkcijom aflatoksina (Bhatnagar i sar, 2006). Sa druge strane, metabolička sudbina molekula i njegova biotransformacija u organizmu životinja i čoveka su daleko više istraženi i opisani. Studije izvedene u novije vreme (Bhatnagar i sar, 2003; Chang i sar, 2003) su pokazale da put sinteze aflatoksina odgovara poliketidnom tipu i da su geni *A. flavus* i *A. parasiticus* odgovorni za biosintetički put aflatoksina deo klaster gena zajedničkog evolutivnog pretka ovih plesni. Nakon unošenja AfB₁ u organizam dolazi do niza biohemijskih reakcija i nastajanja veoma različitih produkata u zavisnosti od metaboličkih puteva kojima molekul može biti podvrgnut. Važno je naglasiti da AfB₁ sam po sebi nije karcinogeno jedinjenje i da svi štetni efekti nastaju kao posledica njegovog metabolisanja (Swenson i sar, 1974) i nastanka AfB₁-8-9-epoksida mehanizmom oksidacije 8,9-vinil etarske veze.



Slika 3. Biotransformacija AfB₁ u AfB₁-8-9-epoksid

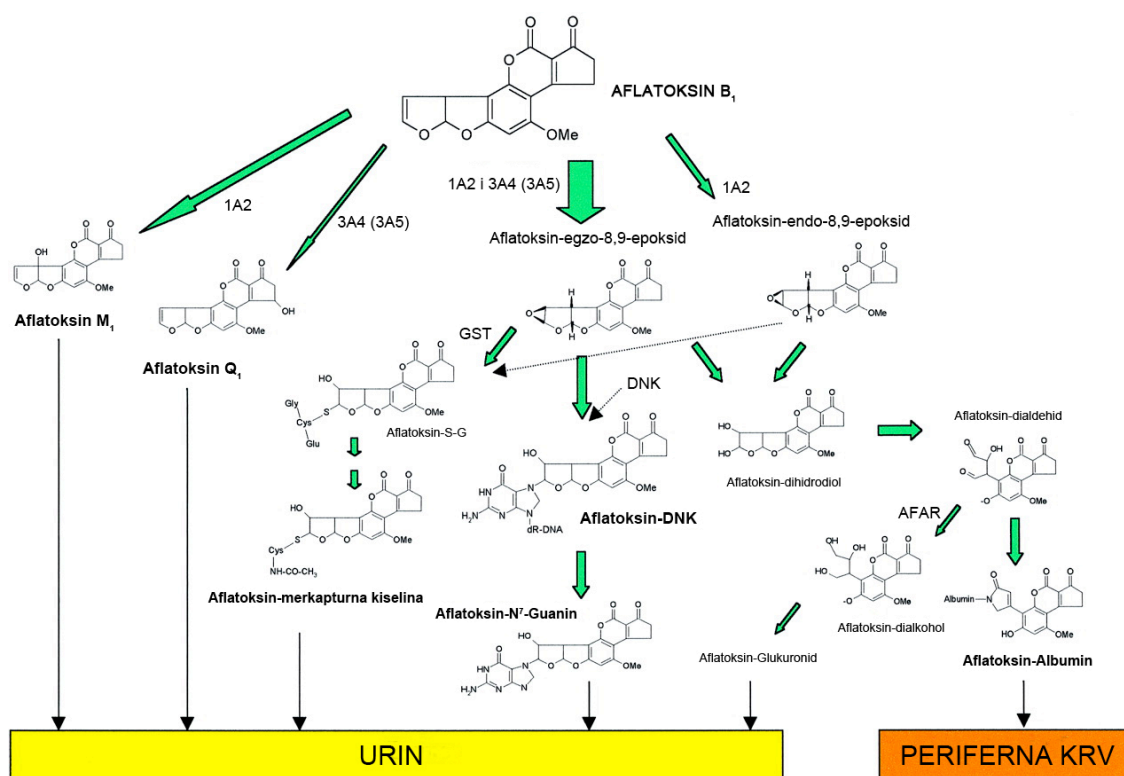
Ovu reakciju prvi je opisao Paterson (Patterson, 1973), a detaljan put biotransformacije je opisan u radu Uena i sar. (1978). Nakon transporta molekula AfB₁ kroz plazminu membranu, dolazi do njegove aktivacije mikrozomalnim mono-oksigenazama uz prisustvo citohroma P-450, NADPH i molekuskog kiseonika.

Proizvod reakcije je visokoreaktivni AfB₁-8-9-epoksid. Ovo jedinjenje se vezuje za jedarnu DNK pri čemu dolazi do oštećenja jedra, ili se vezuje za specifična mesta na endoplazmatskom retikulumu što rezultira odvajanjem ribozoma sa membrana retikuluma i degradacijom polizoma (Kasper i Gonzales, 1982).

Jedan od metaboličkih puteva, naročito prisutan kod preživara je i reverzibilna konverzija AfB₁ uz pomoć NADPH-reduktaze u aflatoksikol, koji sa jedne strane predstavlja produkt detoksikacije, ali imajući u vidu reverzibilnost reakcije, može da služi i kao "rezervoar" iz koga će nastati novi molekuli epoksida (Patterson, 1973; Hsieh i sar, 1977; Wong i Hsieh, 1982).

Aflatoksin B₁-epoksid može biti podvrgnut i reakciji hidratacije pri čemu nastaje 8,9-dihidro-8,9-dihidroksi AfB₁ koji se preko posredničkog molekula aflatoksina B_{2a} (AfB_{2a}) vezuje za bočne lance aminokiselina u proteinima i formira Šifovu bazu (Neal i Colley, 1979). AfB_{2a} inkorporisan u strukturne elemente ćelije zatim može izazvati sve efekte koje ispoljava i AfB₁ (Hsieh i sar, 1977).

Sistem mikrozomalnih mono-oksigenaza je zaslužan i za druge puteve biotransformacije AfB₁ i to u polarne molekule kao što su AfM₁, aflatoksin P₁ (AfP₁) i aflatoksin Q₁ (AfQ₁). Zahvaljujući svojoj polarnosti, ovi molekuli se lakše eliminišu iz organizma putem urina i/ili mleka. Iako su se AfM₁, AfP₁ i AfQ₁ smatrali manje toksičnim i karcinogenim, oni (a naročito AfM₁) imaju veliki značaj zbog pojava rezidua u mleku.

Slika 4. Metabolički putevi aflatoksina B₁ (izvor: WHO, 1979)

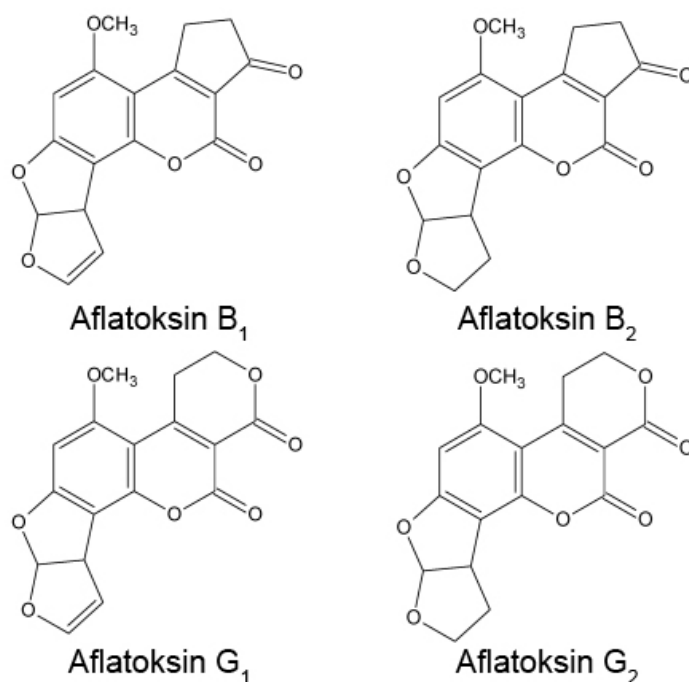
Detoksikacioni kapaciteti organizma u odnosu na aflatoksine uključuju niz mehanizama, u prvom redu konjugovanje sa glukuronskom kiselinom, sulfatima ili glutationatima (Hsieh, 1987). Primarna reakcija detoksikacije je konjugacija reaktivnog AfB₁-8-9-epoksida sa glutationatom uz pomoć enzima glutation S-transferaze (GST) (Degen i Neuman, 1978;1981). Dobijeni konjugat se izlučuje putem žuči (Hsieh, 1987). Međutim, isti autor navodi i mogućnost hidrolize konjugata u gastrointestinalnom traktu, formiranja "nativnog" AfB₁ i njegove reapsorpcije i ulaska u enterohepatičnu cirkulaciju (Hsieh i Wong, 1987). Drugi autori (Hayes i sar, 1991) opisuju još jedan put detoksikacije, konverziju AfB₁-8-9-epoksida putem UDP-glukuronil transferaze-sulfottransferaze.

Iz svega navedenog proističe da je metabolička sudbina AfB₁ u organizmu kompleksna. Ovim se mogu objasniti i razlike u prijemčivosti, odnosno

rezistentnosti pojedinih vrsta na AfB₁. Drugim rečima, razlike kako u putevima aktivacije AfB₁, tako i u mehanizmima detoksikacije i eliminacije iz organizma putem konjugacije su jedan od faktora koji određuju posledice unošenja AfB₁ kod pojedinih vrsta (Hsieh i sar, 1974; Roebuck i Wogan, 1977). U prilog ovoj tezi idu i rezultati eksperimenta objavljeni u istom radu, gde se saopštava da rezistentne vrste na AfB₁ (miš, majmun, čovek) eliminišu AfP₁ i AfQ₁, dok to nije slučaj sa prijemčivim vrstama (patka, pacov). Mehanizam rezistencije pojedinih vrsta se delom može objasniti i smanjenom produkcijom adukata mitohondrijalne DNK u ćelijama jetre pri izlaganju AfB₁ (Bhat i sar, 1980).

2.4 Toksičnost aflatoksina B₁

Od svih aflatoksina, AfB₁ ispoljava najveću akutnu i hroničnu toksičnost, kao i mutagenost, teratogenost i kancerogenost (Ueno i Ueno, 1978). Za većinu životinjskih vrsta, LD₅₀ za AfB₁ iznosi od 0,36 mg/kg do 10 mg/kg telesne mase (TM). Sa druge strane, toksičnost drugih aflatoksina varira, te tako eksperimentalno utvrđene vrednosti LD₅₀ za AfB₁, AfG₁, AfB₂ i AfG₂ kod pačića koji se smatraju veoma prijemčivom vrstom za aflatoksine iznosi 0,36; 0,78; 1,70 i 3,44 mg/kg TM. (Carnaghan i sar, 1963). Za ostale vrste životinja LD₅₀ vrednosti su drugačije ali kod svih vrsta AfB₁ predstavlja najpotentniji toksin dok AfG₂ ispoljava najslabiju toksičnost i posledično najvišu LD₅₀ vrednost. AfB₂ i AfG₁ se nalaze između, tako da se red akutne i hronične toksičnosti aflatoksina može prikazati na sledeći način: AfB₁>AfG₁>AfB₂>AfG₂. Ovakav redosled je posledica načina formiranja epoksida oksidacijom dvostruke veze na 8,9 položaju (Slika 3) kao i veće reaktivnosti jedinjenja sa ciklopentanskim prstenom (AfB₁, AfB₂) u odnosu na cikloheksanski laktonski prsten (AfG₁, AfG₂) (Wogan, 1966, McLean i Dutton, 1995). Slika 5 ilustruje navedene strukture.

Slika 5. Aflatoksini B₁, G₁, B₂ i G₂

Pored varijacija u toksičnim efektima između pojedinih aflatoksina, veoma je značajna i varijabilnost efekata akutne i hronične toksičnosti prvenstveno AfB₁ među različitim vrstama životinja. Ovce, psi i pacovi se smatraju ekstremno prijemčivim životinjama, dok se majmuni, kokoši i miševi smatraju mnogo manje osetljivima. Preživari spadaju u manje prijemčive životinje na štetno dejstvo mikotoksina uopšte, pa i AfB₁, zahvaljujući detoksifikacionom kapacitetu mikroflora buraga koja svojom metaboličkom aktivnošću transformiše AfB₁ u aflatoksikol i na taj način štiti životinju od njegovih štetnih dejstava (Fink-Gremmels, 2008). Sa druge strane, reakcija u kojoj se formira aflatoksikol je reverzibilna, te uvek postoji mogućnost interkonverzije u AfB₁ (Nakazato i sar, 1990). Treba imati u vidu i da je kapacitet mikroflora buraga ograničen, i primarno zavisi od načina ishrane životinja kao i pojave patoloških metaboličkih stanja vezanih za isharnu kao što je metabolička acidoza. Tada je eliminacija toksina putem mikroflora znatno manja, te dolazi do snažnog ulaska AfB₁ u krvotok i

njegove biotransformacije u jetri što za posledicu ima sasvim drugačiji metabolički put, pri kome dolazi do hidrosilacije AfB₁ i nastanka AfM₁ (Fink-Gremmels, 2005, Jouany i Diaz, 2005).

Iako i samo ime aflatoksina implicira toksičnost kao osnovno svojstvo ovih molekula, treba naglasiti da su slučajevi akutne intoksikacije životinja i ljudi veoma retki u prirodnim uslovima. Iz ovog razloga vrednosti LD₅₀ za ljude nisu ustanovljene iako postoje epidemiološki dokazi o ulozi aflatoksina B₁ u pojavi karcinoma jetre i povećanog mortaliteta novorođenčadi u Africi, jugoistočnoj Aziji i Indiji (Hsieh, 1986). Akutna hepatična nekroza i hiperplazija žučnih puteva su simptomi akutnih trovanja aflatoksinima kod živine (Newberne i Butler, 1969). Gubici na telesnoj masi i uvećanje jetre i bubrega je zabeleženo u *in vivo* eksperimentima na brojlerima (Smith i sar, 1970). Mehanizam toksičnog i karcinogenog dejstva AfB₁ je, pored eksperimentalnih životinja, najbolje opisan kod živine s obzirom na njihovu visoku osetljivost i posledične velike direktne i indirektno ekonomske gubitke usled izlaganja toksinu. Ključnu ulogu u metabolizmu AfB₁ igra citohrom P450, kompleks oksidaza koje katalizuju biotransformaciju velikog broja ksenobiotika u organizmu (Rawal i sar, 2010). Ovaj kompleks, kao što je to ranije naglašeno, katalizuje biotransformaciju AfB₁ u visoko reaktivni AfB₁-8-9-epoksid koji alkilacijom formira N⁷ guaninske adukte DNK i tako ispoljava karcinogeno dejstvo (Lin i sar, 1977). Dokazano je da je citohrom P450 u jetri ćuraka ima između 1,8 i 3,5 puta veću aktivnost ka AfB₁ u odnosu na druge vrste živine čime se objašnjava visoka prijemčivost ćuraka a samim tim i incidenca oboljevanja (Lozano i Diaz, 2006). Imunosupresivno dejstvo AfB₁ je potvrđeno u *in vitro* eksperimentima na izolovanim makrofagima. U tim eksperimentima ustanovljeno je dozno-zavisno smanjenje adherentnog potencijala makrofaga i povećanje broja ćelijskih oštećenja što je za posledicu imalo značajnu inhibiciju fagocitnog potencijala (Neldon-Ortiz i Qureshi, 1992). Brojna neželjena dejstva AfB₁ dokumentovana su i u eksperimentima na svinjama: smanjenje dnevnog prirasta, i uvećanje mase jetre uz hepatocelularne lezije zabeleženi su kod

svinja kojima su davane visoke doze AfB₁ od 1,48mg/kg hrane. Iako kod davanja nižih doza u *in vivo* eksperimentima nisu zabeležene ćelijske lezije i druge patohistološke promene, pad proizvodnih rezultata je zabeležen i kod davanja višestruko nižih doza (Southern i Clawson, 1979). Neki autori nude objašnjenje mehanizma gubitka telesne mase usled izloženosti aflatoksinu B₁, kroz zabeleženi pad serumskih koncentracija albumina i ukupnih proteina (Southern i Clawson, 1979; Harvey i sar, 1988, Linderman i sar, 1993).

Primeri štetnih akutnih efekata aflatoksina opisani kod ljudi su malobrojni i ograničeni na izučavanja retkih prikaza slučaja. Akutna trovanja ljudi čija se etiologija pripisuje AfB₁ su zabeležena u nekim oblastima Kine i Afrike, i manifestovala su se akutnim toksičnim hepatitisom sa mortalitetom od 10 do 60% (Bhat i Krishnamachari, 1977). Drugi slučaj predstavlja mladu žensku osobu koja je pokušala samoubistvo na bizaran način, prečišćenim aflatoksinom B₁ unevši 5,5 mg AfB₁ tokom 2 dana, a nakon 6 meseci nastavlja sa unosom još 35 mg tokom dve nedelje (Willis i sar, 1980). Simptomi su bili osip bez prisustva svraba, mučnina i glavobolja. Žena se u potpunosti oporavila, i nakon 14 godina praćenja njenog zdravstvenog stanja nisu zabeležene patološke promene na jetri. Rezultati iz ove i drugih prikaza slučaja ukazuju da veću opasnost po zdravlje predstavlja unošenje subakutnih doza tokom dugog perioda (što je zabeleženo u nerazvijenim zemljama), gde nakon prolongiranog unošenja može doći do indukovanja akutnih manifestacija toksemije sa letalnim ishodom (Willis i sar, 1980; Peraica i sar, 1999).

Daleko najveći rizik od aflatoksina za ljude predstavlja dugotrajna hronična ekspozicija putem kontaminirane hrane. Izlaganje toksinu na ovaj način je povezano za hepatocelularnim karcinomima, naročito kod osoba prethodno inficiranih virusom hepatitisa B (Hussein i Brasel, 2001). Primarni hepatocelularni karcinom je značajno prisutniji u područjima sa visokom prevalencom nosilaca HbsAG - hepatitis B serumskog antigena (JECFA, 1998; Henry i sar, 1999,2001). U područjima Kine i podsaharske Afrike, godišnje se zabeleži oko 250 000 smrtnih

slučajeva uzrokovanih hepatocelularnim karcinomima (Groopman i sar, 1992), što se objašnjava visokim faktorima rizika kao što su visoka prosečna dnevna doza od 1,4 ug/dan AfB₁ (Wild i sar, 1992) i visoka incidenca hepatitisa B (Kensler i sar, 1997; Wild i sar, 1992).

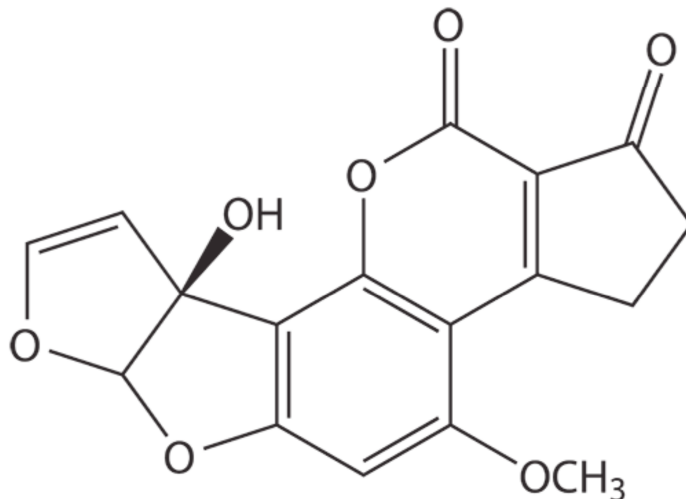
Oboljenje kvašiorkor kod dece u nerazvijenim afričkim i azijskim zemljama koje se karakteriše edemima bez pojave ascita i hipoalbuminemijom se takođe dovodi u vezu sa prisustvom AfB₁ u ishrani (Hendrickse i sar, 1984). Iako je etiologija bolesti kompleksna i još uvek nedovoljno objašnjena, postoji dovoljno podataka koji povezuju kvašiorkor sa ishranom namirnicama kontaminiranih plesnima, naročito ako se ima u vidu činjenica da deca obolela od kvašiorkora uvek imaju višak ugljenih hidrata u ishrani. Studija koja opisuje pojavu ove bolesti u Sudanu (Coulter i sar, 1986) pokazuje povezanost oboljenja sa sadržajem AfB₁ u hrani.

Aflatoksin B₁ je prema klasifikaciji međunarodne Agencije za ispitivanje kancera (IARC), 1993. godine klasifikovan kao dokazani karcinogen i svrstan u grupu 1A (IARC, 1993).

Svetska zdravstvena organizacija je 1998. godine objavila obimnu evaluacionu studiju o aflatoksinima gde se uz pregršt literaturnih podataka sumiraju svi štetni efekti aflatoksina (WHO, JECFA 1998).

2.5 Opšte osobine, metabolizam i toksičnost aflatoksina M₁

Aflatoksin M₁ predstavlja 4-hidroksi derivat aflatoksina B₁ i od njega se strukturno razlikuje samo po prisustvu –OH grupe na furanovom prstenu.



Slika 6. Hemijska struktura aflatoksina M₁

Molekulska masa AfM₁ je 312 a zbirna formula C₁₇H₁₂O₇. Pored AfM₁ opisani su i drugi metaboliti aflatoksina koji se izlučuju mlekom, aflatoksin M₂ (AfM₂) – metabolit AfB₂ kao i aflatoksin M₄ (AfM₄) koji je drugi hidroksi-metabolit AfB₁ (Gorelick, 1990, McLean i Dutton, 1995). Međutim, u odnosu na AfM₁, prisustvo AfM₂ i AfM₄, kao i ostalih metabolita jetre (AfP₁, AfQ₁) je zabeleženo u mnogo manjem obimu, te samim tim ova jedinjenja imaju daleko manji značaj za javno zdravlje (EFSA, 2004). Kao i drugi aflatoksini, i AfM₁ je termostabilan pa temperature pasterizacije i sterilizacije mleka, kao i ostalih temperaturnih režima obrade pri proizvodnji mlečnih proizvoda veoma malo ili uopšte ne utiču na eventualnu razgradnju toksina (Van Egmond i sar, 1977; Wiseman i Marth, 1983; Yousef i Marth, 1989; Govaris i sar, 2002; Prandini i sar, 2009)

Akutna i hronična toksičnost AfM₁ je ekvivalentna toksičnosti AfB₁, ali je karcinogeni potencijal manji (Carnaghan i sar, 1963). Ovo potvrđuju i podaci iz novije literature (Henry i sar, 2002), gde se tvrdi da je karcinogena potentnost

AfM₁ 10 do 100 puta manja u odnosu na AfB₁. Uprkos tome, kao i činjenici da, metabolički gledano, AfM₁ predstavlja produkt detoksifikacije (Neal i sar, 1998), njegova štetna dejstva na zdravlje životinja su veoma detaljno dokumentovana u literaturi. Sa druge strane, podaci o mogućim štetnim efektima AfM₁ na ljude nisu dovoljno opisani (EFSA, 2004). Ograničene studije na eksperimentalnim životinjama ukazuju na hepatotoksični i hepatokarcinogeni potencijal. Malobrojne studije pokazuju da se AfM₁ može naći i u mleku žena u periodu dojenja (El-Sayed i sar, 2002), gde autori iznose podatke o sadržaju AfM₁ u mleku žena iz Egipta od 0,3 do 0,5 µg/L uz srednji nivo istog jedinjenja u krvi od 1,2 µg/L.

Iz ovih razloga, IARC u svojoj studiji iz 1993. godine, najpre svrstava AfM₁ u grupu 2B (nedokazani ali potentni karcinogen), dok poslednja studija iste oranizacije iz 2002. godine sve prirodno sintetisane aflatoksine, pa i AfM₁ svrstava u grupu 1 – dokazani karcinogeni za ljude (IARC, 1993; IARC, 2002).

Metabolički put nastanka AfM₁ u jetri (naročito kod preživara) je opisan u prethodnom poglavlju. Proizvodnja AfM₁ u organizmu preživara i, što je od posebnog značaja, stepen konverzije AfB₁ u AfM₁ zavise od brojnih faktora, od kojih je najvažniji količina unetog AfB₁ putem hrane za životinje. Sa druge strane, značajno povećanje proizvodnih potencijala mlečnih goveda u prethodnim decenijama putem selekcije i velikih pomaka u istom pravcu zahvaljujući optimizaciji ishrane ovih životinja doveli su do učestalijih pojava metaboličkih oboljenja visokomlečnih grla kao što su ketoza i acidoza buraga (Fink-Gremmels, 2008). Period zasušenja pred partus, sam partus i posledično naglo povećanje mlečnosti predstavljaju za organizam dramatične promene sa metaboličkog aspekta. Tada dolazi do povećanja potreba za kalcijumom i svarljivom energijom, dok se još uvek osećaju posledice smanjenja obroka pred partus (za oko 20%). Posledično, dolazi do negativnog energetskeg bilansa, mobilizacije masnih depoa, hepaticne lipidoze i sistemske ketoze (Greelen i Wensing, 2006). Način da se ovakvo stanje prevaziđe je ishrana visokoenergetskom hranom bogatom lako svarljivim ugljenim hidratima, kao što su potpune smeše sa visokim sadržajem

kukuruz. Ukoliko kukuruz sadrži AfB₁ u većoj količini, dolazi do zasićenja detosikacione sposobnosti mikroflora buraga da AfB₁ metaboliše u aflatoksikol. Na ovaj način dolazi do prelaska AfB₁ u sistemsku cirkulaciju i njegove hidroksilacije u jetri, te nastanka AfM₁ (Jouany i Diaz, 2005). Iz ovoga se može izvesti zaključak da visokomlečna grla imaju veću sposobnost konverzije AfB₁ u AfM₁. Ipak, kod preživara, znatan deo unetog AfB₁ se metaboliše u buragu i nikada ne uđe u sistemsku cirkulaciju (EFSA, 2004). Deo AfB₁ koji se nađe u cirkulaciji biva brzo metabolisan u jetri hidroksilacijom do AfM₁ koji može biti slobodan u cirkulaciji ili podleže procesu glukuronizacije i biva eliminisan putem žuči. Slobodan AfM₁ se potom javlja u urinu i mleku (EFSA, 2004). U prvim saopštenjima, procenjivalo se da ukupna količina AfM₁ izlučena mlekom predstavlja 1-2% ukupnog AfB₁ unetog u organizam (Van Egmond, 1989). Međutim, kod visoko-mlečnih grla, promene u mleko-plazma barijeri u vimenu u kombinaciji sa konzumiranjem većih količina koncentrovanih hraniva dovodi do višeg stepena konverzije, te tako Veldmann i sar (1992) saopštavaju da je eksperimentalno potvrđen procenat konverzije i do 6,2%.

Paterson (Patterson, 1998) je na osnovu svih podataka publikovanih u literaturi od 1985. godine koji uključuju 10 zapažanja iz 5 kontrolisanih eksperimenata izradio regresionu krivu konverzije AfB₁ u AfM₁ u mleko krava koje su hranjene potpunim smešama sa aflatoksinom B₁ u količini oko MDK vrednosti (20 ng/kg). Jednačina koja opisuje krivu je sledeća:

$$\text{AfM}_1 \text{ (ng/kg)} = 10,95 + 0,787 \times (\mu\text{g AfB}_1 \text{ unetog tokom 1 dana})$$

Koeficijent korelacije regresione krive je 0,956 ($r^2 = 0,915$). Proširivanjem analize na sve eksperimente u kojima je dnevni unos AfB₁ bio manji od 150 μg AfB₁ (10 zapažanja iz 6 studija), ali zanemarujući individualni prinos mleka po grlu, regresioni koeficijent je bio znatno manji ($r^2 = 0,417$).

Na osnovu ovih podataka, ekspertski panel za kontaminante u lancu hrane osnovan od strane evropske Agencije za bezbednost hrane, je sačinio matematički

proračun konverzije AfB₁ u AfM₁ kod različitih vrsta životinja i pri različitim režimima ishrane kontaminiranom hranom, kao i pri dve vrednosti za konverziju (2% i 6%). Podaci za mlečna goveda su prikazani u Tabeli 1.

Tabela 1. Procenjena koncentracija AfM₁ u mleku krava sa stepenom konverzije od 2 i 6% (izvor: EFSA, 2004 – deo originalne tabele koji se odnosi na goveda)

Scenario	Mlečnost (kg/dan)	Ukupni unos hrane (kg SM/dan)	Dopunske smeše (kg SM/dan)	Hraniva (kg SM/dan)	AfB ₁ u dopunskim smešama (ug/kg)	AfB ₁ u hranivu (ug/kg)	AfB ₁ ukupni unos (ug/kg)	Konverzija AfB ₁ u AfM ₁ (%)	AfM ₁ u mleku (ug/kg)
A	50	26,0	19,5	6,5	5,0	20,0	227,5	6	0,27
B	25	17,5	7,0	11,5	5,0	20,0	265,0	2	0,21
C	25	17,5	7,0	11,5	5,0	0	35,0	2	0,03

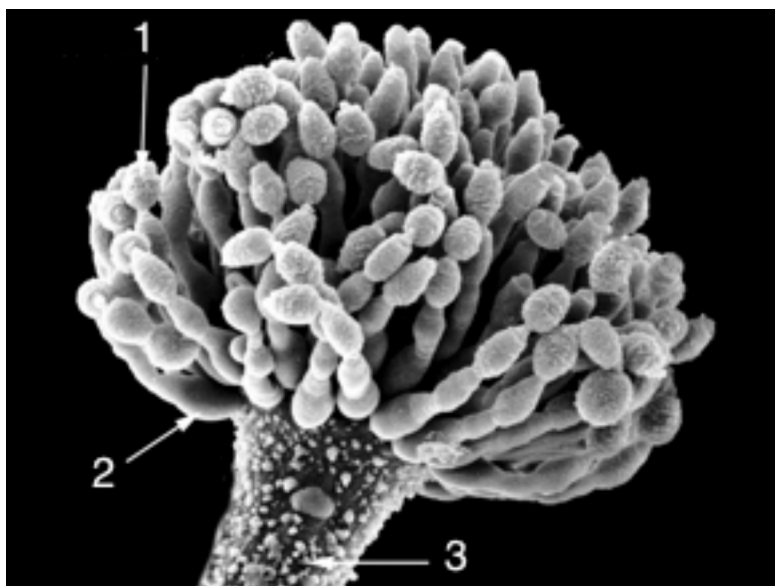
Scenario "A" predstavlja visoko-mlečno grlo izloženo maksimalno dozvoljenoj količini AfB₁ u dopunskoj smeši i hranivu sa konverzijom od 6% (najgori scenario). Scenario "B" predstavlja grlo prosečne mlečnosti izloženo maksimalno dozvoljenoj količini AfB₁ u dopunskoj smeši i hranivu sa konverzijom od 2%. Scenario "C" predstavlja grlo prosečne mlečnosti izloženo maksimalno dozvoljenoj količini AfB₁ u dopunskoj smeši dok samo hranivo ne sadrži AfB₁, sa konverzijom od 2%. Iz tabele se može videti da u prva dva slučaja, sadržaj AfM₁ u mleku višestruko prelazi maksimalno dozvoljenu količinu (0,05 µg/kg prema EU propisima). Ipak, treba naglasiti da se ovde radi o matematičkom modelu i da su verovatnoće da se dogodi upravo jedan od ova tri scenarija male. U realnim uslovima, gotovo uvek se radi o kombinaciji nepovoljnih i povoljnijih okolnosti koje se konstantno smenjuju u vremenu, tako da iskazane numeričke vrednosti za sadržaj AfM₁ treba tumačiti kao orijentacione a nikako kao fiksirane ili unapred date.

Iz svega do sada iznetog, može se zaključiti da aflatoksini predstavljaju značajan i slojevit zdravstveni i proizvodni problem sa kojim se, u različitom stepenu, suočavaju sve zemlje sveta, bilo da se radi o kontaminaciji koja vodi poreklo iz same države, ili o uvezenoj hrani odnosno hrani za životinje. Prikazani podaci iz obimne naučne literature, kao i brojna naučna mišljenja izrađena od strane međunarodnih i nacionalnih ekspertskih panela i državnih agencija (WHO, IARC, JECFA, EFSA), jasno ukazuju na činjenicu da se problematici kontaminacije hrane i hrane za životinja aflatoksinima (u prvom redu sa AfB₁ kao najznačajnijim iz grupe aflatoksina), kao i prisustvu njegovih rezidua u mleku (AfM₁) pristupa veoma ozbiljno. Osnovna pitanja koja se uzimaju u obzir pri iznalaženju rešenja za smanjenje kontaminacije i sprečavanja prisustva rezidua ili njihovo svođenje na bezbedni nivo, jesu proučavanje mogućih puteva kontaminacije u prvom redu hrane za životinje aflatoksinom B₁ kao i faktora koji doprinose pojavi AfB₁ (klimatski faktori, skladištenje...), zatim utvrđivanje maksimalno dozvoljenih količina za AfB₁ i AfM₁, kao i razvoj analitičkih metoda i protokola za pouzdano kvantitativno određivanje njihovog sadržaja u cilju sagledavanja stvarnog stanja kontaminacije i/ili prisustva rezidua na određenom području, radi usklađivanja sa propisanim zakonskim limitima.

2.6 Infestacija kukuruza plesnima roda *Aspergillus*

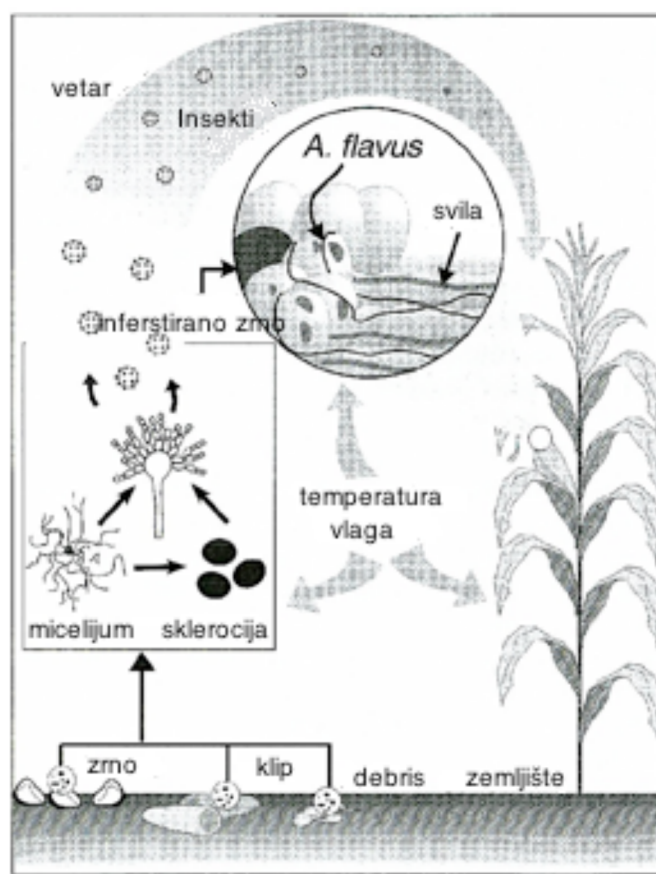
Danas je poznato da su dve vrste plesni iz roda *Aspergillus* odgovorne za produkciju aflatoksina: *A. Flavus* i *A. parasiticus*. *Aspergillus* vrste su ubikvitarne plesni, široko rasprostranjene u prirodi. Često se mogu izolovati iz zemljišta, naročito u tropskom i subtropskom pojasu, iz hrane za životinje, skladištene zrnaste hrane, kao i iz raznih vrsta namirnica. (EFSA, 2012). Ove plesni imaju ulogu u procesu dekompozicije biljnog materijala na poljoprivrednim površinama. Neke vrste roda *Aspergillus* su patogene samo za insekte, dok *A. flavus* i *A. parasiticus* mogu biti patogeni i za više životinje i čoveka (Rapner i Fennel, 1965). Ove dve srodne vrste su odgovorne za kontaminaciju primarnih poljoprivrednih proizvoda na poljima kao i nakon žetve (Diener i sar, 1987). Isti autori navode i jednu značajnu razliku između *A. flavus* i *A. Parasiticus*. *A. parasiticus* je prevashodno adaptiran na život u zemljištu i zato infestira samo kikiriki, dok je životno stanište za *A. flavus* primarno nadzemni, tj. lisnati deo biljke te najčešće infestira kukuruz, pamuk i koštunjavo voće. Novija istraživanja, međutim, donekle osporavaju ova saznanja (Abbas i sar, 2005; Costa i sar, 2009; Pildain i sar, 2005). Jedan od razloga za ovu protivrečnost je i činjenica da su DNK profili obe vrste različiti do nivoa od samo 4% (Cary i Ehrlich, 2006).

Aspergillus vrste se karakterišu lakom kolonizacijom zemljišta i organske materije biljnog porekla prisutne na poljoprivrednim površinama. U ovakvim staništima, plesni su sposobne da prežive zimu u vidu micelijuma (vegetativni deo plesni koji se sastoji od dugačkih, razgranatih struktura – fijalida) ili sklerotija (kompaktna masa stvrdnutih micelijuma koja sadrži rezerve hranljivih materija). Pri pojavi povoljnih uslova, nakon zimskog perioda, iz navedenih struktura nastaju konidiofore – spore plesni, od kojih aseksualnim deobama nastaje novi organizam i ponovo započinje ciklus infestacije biljke. Najvažniji faktori koji podstiču razmnožavanje plesni iz roda *Aspergillus* su temperatura i vlaga u zemljištu.



Slika 7. *Aspergillus flavus* snimljen tehnikom elektronske mikrofografije. 1 – Konidije; 2- Fijalide; 3- Konidiofore (izvor: University of Guelph, Kanada)

Životni ciklus *A. flavus* se može podeliti na dve faze: kolonizacija ostataka biljnog materijala na poljoprivrednim površinama nakon žetve i infestacija biljnog tkiva živih biljaka na tom zemljištu nakon sledeće setve. U fazi rasta biljke, i pri nastanku povoljnih uslova spoljašnje sredine, sklerotije i konidije koje su opstale u zimskim uslovima, germiniraju u micelijum koji zatim proizvodi brojne konidiospore sa posledičnim oslobađanjem konidija u vazduh. Najznačajniji vektori za prenošenje konidija na mladu biljku su insekti i vetar, i ovo je naročito karakteristično za poljoprivredne kulture kao što je kukuruz, pamuk, kikiriki i za koštunjavo voće (Horn, 2005; Northolt, 1979, Payne, 1998; Scheidegger i Payne, 2005).



Slika 8. Šematski prikaz ciklusa infestacije kukuruza sa *A. flavus*

(izvor: EFSA, 2012)

Pored vektora, na stepen i ishod infestacije utiču i broj spora kao i prijemčivost biljaka, i populacija insekata na poljoprivrednim površinama (Northolt, 1979). Dowd i sar. (2005) ukazuju i na period rasta biljke u kojem je došlo do oštećenja zrna putem insekata, kao na još jedan značajan faktor imajući u vidu da obim produkcije aflatoksina direktno zavisi od sadržaja vode u biljci i zrnu.

Proizvodnja aflatoksina na infestiranom kukuruзу počinje kada sadržaj vlage u zrnu opadne ispod 32% (Payne, 1998) i nastavlja se dok ne dostigne 15%. Dowd i sar. (2005) saopštavaju da ukoliko insekti oštete zrno kada je sadržaj vlage već opao, posledična kontaminacija aflatoksinima će biti mala, osim u slučaju da neposredno pre žetve dođe do padavina. Isto se dešava kod odložene žetve, i ako tada dođe do padavina, nivoi aflatoksina se značajno povećavaju (Cotty i Jaime-

Garcia, 2007). Kukuruz je najpodložniji infestaciji plesnima u fazi cvetanja i naročito u fazi svilanja.

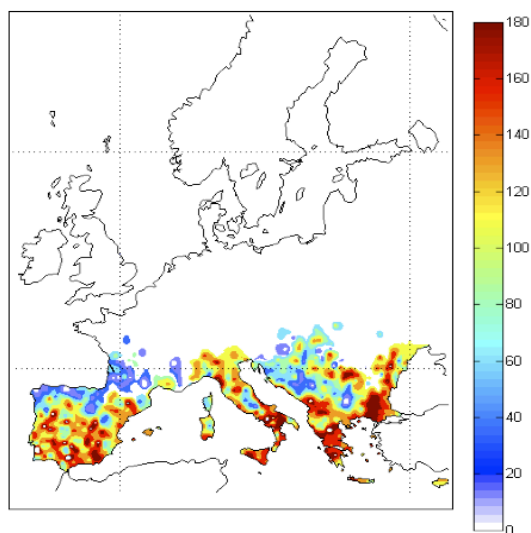
Infestacija kukuruza *Aspergillus* plesnima se dešava i nakon žetve, prilikom skladištenja, što rezultira sekundarnom kontaminacijom aflatoksinima, naročito ako su procesi sušenja zrna i samog skladištenja tehnološki neadekvatni. Iako se govori o sekundarnoj kontaminaciji, treba imati u vidu da je poreklo samog inokuluma svakako sa polja, odnosno, zrna kukuruza infestirana na poljima predstavljaju infektivni materijal za kukuruz koji se skladišti u silosima. Rast plesni se u ovim uslovima može očekivati sve dok je sadržaj vlage u zrnu 8-12% ($a_w=0,73$), dok se proizvodnja aflatoksina odvija na minimalno 7-19% sadržaja vlage što korespondira a_w vrednosti od 0,85 (EFSA, 2012; Bryden, 2012). Količina sintetisanog AfB₁ zavisi od brojnih faktora (Frisvald, 1995; Wicklow, 1995) – fizičkih (sadržaj vlage, relativne vlažnosti vazduha, temperature i stepena mehaničkog oštećenja zrna), zatim hemijskih (odnos koncentracija kiseonika i ugljen dioksida, hemijskog sadržaja substrata, odnosno kukuruza, prisustva pesticida i fungicida), kao i bioloških faktora (vrste, soja odnosno hibrida kukuruza, stresa, prisustva insekata i broja spora plesni). Međutim, temperatura i vlaga igraju daleko najvažniju ulogu u pojavi plesni i posledičnoj kontaminaciji kukuruza u polju (Bryden, 2012). Toksikogene plesni koje infestiraju kukuruz na njivama obično zahtevaju veće vrednosti vlage (200-250 g/kg) od plesni koje se formiraju i rastu u uskladištenom kukuruзу (130-180 g/kg). Takođe, treba naglasiti i istraživanje koje je sproveo Magan, 2006. godine, gde se navodi da proizvodnja toksina nije obavezno proporcionalna ukupnoj biomasi plesni, već zavisi od brojnih faktora spoljašnje sredine ili mikroklimatskih faktora tokom skladištenja. Navođenje obilja literaturnih podataka koji se odnose na faktore (osim temperature i vlage) koji utiču na pojavu kontaminacije kukuruza aflatoksinima, daleko bi prevazišlo obim ove disertacije. Međutim, svakako treba imati u vidu i njihovo postojanje kao potencijalno važne pravce budućih istraživanja.

2.7. Klimatske promene - uticaj na kontaminaciju kukuruza aflatoksinom B₁

Prisustvo aflatoksina, kao što je naglašeno u prethodnim poglavljima, uglavnom je bilo vezivano za zemlje, odnosno regione u kojima je dominantna tropska i subtropska klima (EFSA, 2004) s obzirom da su visoka temperatura i sadržaj vlage u zrnu kukuruza dominantni faktori koji utiču na rast i razmnožavanje *Aspergillus* plesni, kao i na produkciju aflatoksina. Ovo je primarni razlog zbog koga se dugo smatralo da aflatoksini ne spadaju u važnije kontaminante hrane i hrane za životinje na evropskom tlu, i da se problem njihove pojave uglavnom vezuje za hranu i hranu za životinje poreklom iz zemalja sa dominantno tropskom i subtropskom klimom pogodnom za rast *Aspergillus* vrsta plesni. Međutim, primarna kontaminacija žitarica (prvenstveno kukuruza) je ipak u nekoliko navrata zabeležena i na evropskom kontinentu. Petterson i sar, 1989 prijavljuju povećani nivo aflatoksina u proizvodima tretiranim organskim kiselinama u cilju produžavanja održivosti. Skorašnja kontaminacija kukuruza aflatoksinom je zabeležena i u Italiji na usevima gajenim u dolini reke Po (Pieti i Diaz, 2003) usled visokih temperatura i suše. Nešto ranije, 1999. godine zabeležena je izuzetno visoka kontaminacija kukuruza aflatoksinom na srednjem zapadu Sjedinjenih američkih država (Windham i Williams, 1999; Windham i sar, 1999) koja je po nanetoj direktnoj i indirektnoj materijalnoj šteti proglašena ekonomskom katastrofom (Abbas i sar, 2006), a dogodila se u području koje se inače karakteriše umereno-kontinentalnom do kontinentalnom klimom.

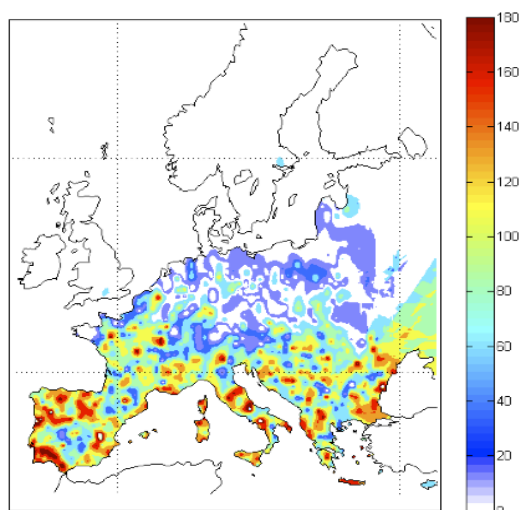
Stoga je uticaj klimatskih promena u skorije vreme identifikovan kao veoma značajno pitanje u kontekstu bezbednosti hrane (EFSA, 2012). Panel evropske Agencije za bezbednost hrane je identifikovao promenu u obrascu kontaminacije žitarica (kukuruz, pšenica, pirinač) mikotoksinima a naročito aflatoksinima usled klimatskih promena na evropskom kontinentu, a naročito u južnim i

mediteranskim delovima Evropske unije. Januara 2012. godine je kao rezultat objavljena veoma obimna studija u vidu naučnog mišljenja sa naslovom “Modelovanje, predviđanje i mapiranje pojave aflatoksina u žitaricama u EU usled klimatskih promena” (EFSA, 2012). Imajući u vidu da je od ukupno četiri aflatoksina, AfB₁ dominantno prisutan, kao i da u većini prikazanih literaturnih podataka AfB₂, AfG₁ i AfG₂ nisu bili izmereni u značajnoj količini, naučno mišljenje je fokusirano na AfB₁ kao najznačajnijeg predstavnika ove grupe mikotoksina. Studija je definitivno potvrdila visoku međuzavisnost između pojave aflatoksina pretežno u kukuruзу (pored kukuruza, predmet studije je bila i pšenica kao i pirinač), kao i primenjenog matematičkog modelovanja klimatskih faktora u Evropi u narednih 100 godina. Zaključci do kojih su autori studije došli potvrđuju realnost pojave značajnih nivoa kontaminacije kukuruza na znatno širem području evropskog kontinenta. Slika 9 prikazuje matematički model rizika kontaminacije kukuruza aflatoksinom B₁ u Evropi u periodu od 2000-2100. godine ukoliko se primeni predviđanje globalnog porasta prosečne temperature za 2°C. Paletom boja je predstavljena veličina nazvana “Af indeks rizika” (engl. Af risk index). Bela boja označava zanemarljiv rizik dok tamno crvena predstavlja kritičan rizik.



Slika 9. Matematički model rizika kontaminacije kukuruza sa AfB₁ – globalni porast prosečne temperature za 2°C (izvor: EFSA, 2012)

Slika 10 prikazuje matematički model rizika kontaminacije kukuruza aflatoksinom B₁ u Evropi u periodu od 2000-2100. godine ukoliko se primeni predviđanje globalnog porasta prosečne temperature za 5°C

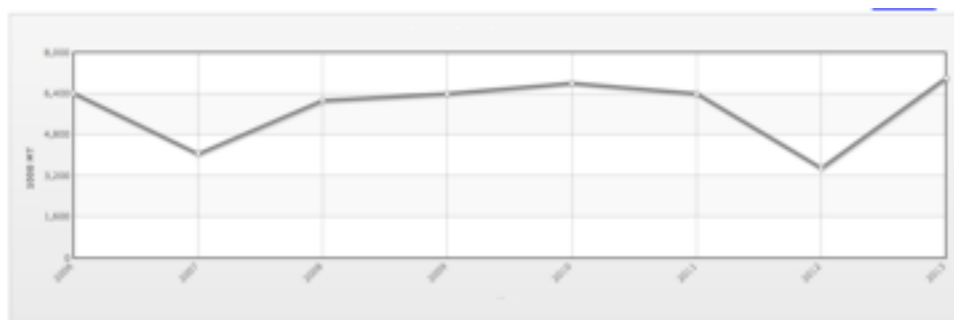


Slika 10. Matematički model rizika kontaminacije kukuruza sa AfB₁ – globalni porast prosečne temperature za 5°C (izvor: EFSA, 2012)

Kritični i visoki rizici od pojave AfB₁ u kukuruзу se predviđaju u nekim oblastima zemalja jugoistočne Evrope (Grčka, južna Italija, Bugarska, Albanija). Kontaminirani kukuruz proizveden na ovim lokacijama može dospeti do stanovništva i izazvati konstantnu ekspoziciju AfB₁. Kontaminacija može biti primarna (rast plesni i produkcija toksina na polju) i sekundarna (razmnožavanje plesni u silosima i dodatna kontaminacija prilikom skladištenja). Kontaminacija AfB₁ može dramatično da se uveća ukoliko se nakon žetve faze sušenja i skladištenja neadekvatno sprovode. Visoki Af indeks rizika se predviđa u centralnoj i južnoj Španiji, Grčkoj u severoistočnom delu i Kipru. Srednji i niski aflatoksin indeks rizika (Af indeks rizika) se predviđa u Rumuniji, Francuskoj, Mađarskoj i severoistočnoj Italiji. Ove zemlje daju 73% ukupne proizvodnje

kukuruz u EU. Iako je indeks rizika manji, ove zemlje moraju da pojačaju praćenje kukuruza na prisustvo AfB₁ u okviru svojih nacionalnih monitoring programa kao i da sačine efikasne sisteme i strategije upozoravanja i obaveštavanja” (EFSA, 2012).

Studija je obuhvatala samo zemlje članice EU, iako je, razumljivo, matematički model u geografskom smislu izrađen za celo područje Evrope. Prema prikazanim rezultatima (slika 9, slika 10), Republika Srbija se nalazi u području srednjeg do visokog Af indeksa rizika. Sa druge strane, Srbija spada u velike proizvođače kukuruza (treći proizvođač u Evropi, iza Rumunije sa 2,3 miliona ha pod kukuruzom i Francuske sa 1,7 miliona hektara) sa 1,3 miliona hektara pod kukuruzom (EFSA, 2012; Statistički godisnjak R. Srbije 2011), i sa godišnjom proizvodnjom koja varira u zavisnosti od sezone, ali prosečno iznosi oko 6,5 miliona tona. Grafikon 1 prikazuje proizvodnju kukuruza u periodu 2006-2013 (FAO, online).

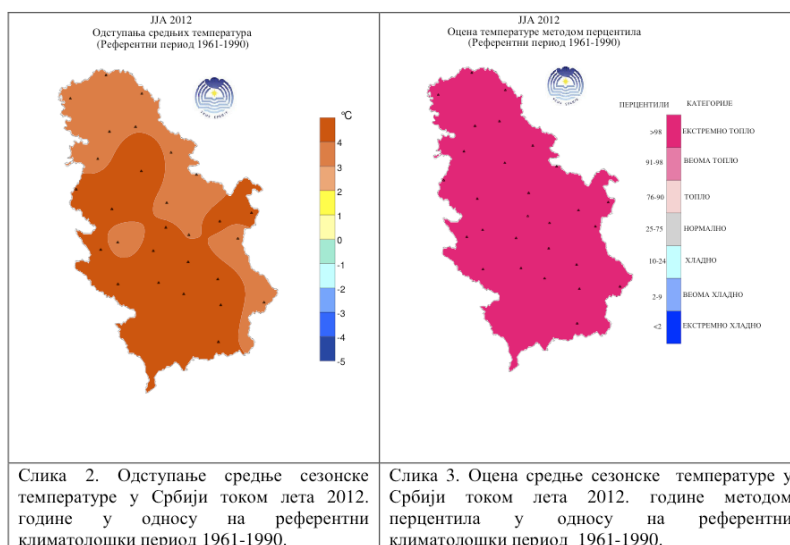


Grafikon 1. Proizvodnja kukuruza u Srbiji 2006-2013 (izvor: FAO, 2012)

Na grafikonu se može videti veliki pad proizvodnje u 2012. godini (3,5 miliona tona u odnosu na 6,4 miliona tona u 2011, što predstavlja pad od 45,31 %). Uzrok ovome je velika suša koja je pogodila celu Evropu, a naročito jugoistočnu Evropu i Balkansko poluostrvo 2012. godine. Sezonski bilten Republičkog Hidrometeorološkog zavoda (RHMZ, 2013), Nacionalni centar za klimatske promene (www.hidmet.gov.rs), leto 2012. godine u Republici Srbiji karakteriše kao

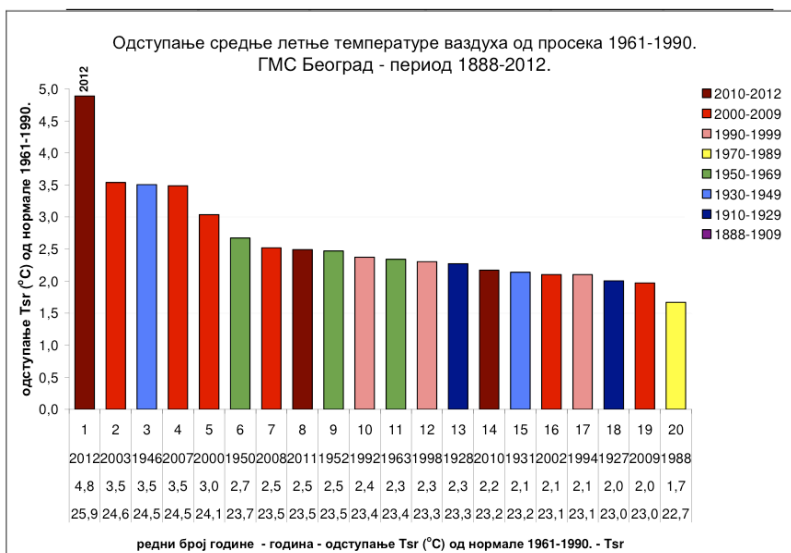
“ekstremno toplo i ekstremno sušno, najtoplije i jedno od najsušnijih od kada postoje meteorološka merenja u Srbiji. Prevaziđen dosadašnji apsolutni maksimum broja tropskih i letnjih dana i tropskih noći za referentni klimatološki period 1961-1990. godine”.

Prema ovom izveštaju, odstupanja srednjih letnjih temperatura od normale su bila pozitivna na teritoriji cele Srbije i iznosila su od 3,1°C do 5°C. Odstupanja srednje maksimalne temperature su bila od 4°C do 5°C a na planinama i do 6°C. Maksimalna dnevna temperatura u Srbiji tokom leta 2012. godine izmerena je u Ćupriji 15. Jula i iznosila je 41,5°C. Slika 11 prikazuje odstupanje srednje letnje temperature vazduha od proseka 1961-1990. godine.



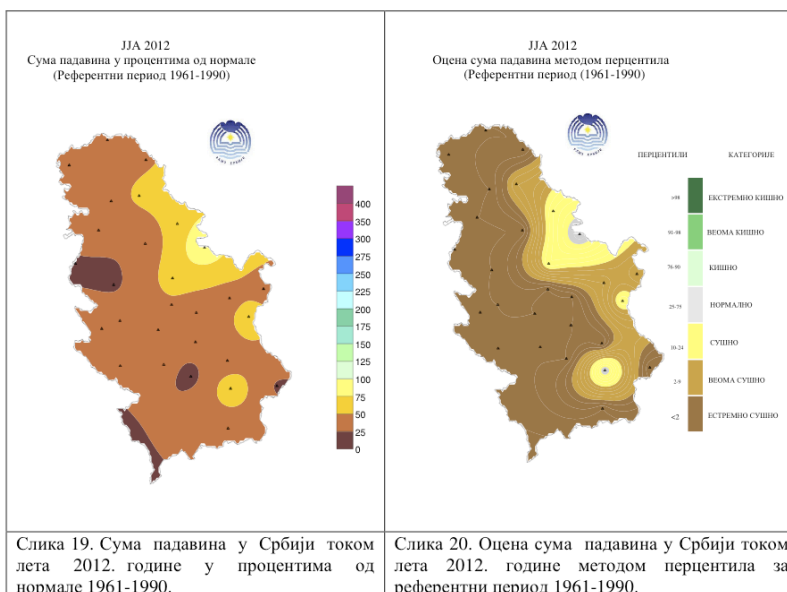
Slika 11. Odstupanje srednje letnje temperature vazduha od proseka 1961-1990. godine (izvor: RHMZ)

U celoj Srbiji je prevaziđen broj tropskih dana sa maksimalnom dnevnom temperaturom višom od 30°C. Grafikon 2 prikazuje 20 najtoplijih leta u Beogradu u periodu 1888-2012. godine.



Grafikon 2. Redosled 20 najtoplijih leta u Beogradu za period 1888-2012. godine (izvor: RHMZ)

Osim temperature, leto 2012. godine je bilo je u pogledu padavina “jedno od najsušnijih od kada postoje merenja. Prema metodi percentila suma letnjih padavina je u većem delu Srbije bila u kategoriji ekstremno sušno i veoma sušno”. Slika 12 prikazuje ocenu suma padavina u Srbiji tokom leta 2012. godine.



Слика 19. Сума падавина у Србији током лета 2012. године у процентима од нормале 1961-1990.

Слика 20. Оцена сума падавина у Србији током лета 2012. године методом перцентила за референтни период 1961-1990.

Slika 12. Ocena suma padavina u Srbiji tokom leta 2012. godine (izvor: RHMZ)

Svi do sada izneti podaci idu u prilog zaključku da usled evidentnih klimatskih promena neminovno dolazi do aktuelizacije pitanja kontaminacije (prvenstveno kukuruza) aflatoksinima i na evropskom kontinentu, naročito u jugoistočnoj Evropi i na području Balkanskog poluostrva. Ovakav scenario se i obistinio u Republici Srbiji krajem 2012. i u 2013. godini kada je zabeležena masovna pojava AfB₁ u kukuruзу i posledično AfM₁ u mleku što je izazvalo veliko interesovanje naučne, stručne i laičke javnosti. Prema dostupnoj naučnoj literaturi, u Republici Srbiji su do sada objavljene dve studije o sadržaju AfB₁ u kukuruзу . U jednoj (Bočarov-Stančić i sar, 2000) dokazano je od 40 do 100 µg/kg AfB₁. U drugoj (Mašić i sar, 2003) je pokazano da je 10,43% od 585 ispitivanih uzoraka bilo kontaminirano aflatoksinom B₁. U 2013 godini je obavljena prva značajnija studija u Srbiji o kontaminaciji mleka sa AfM₁ (Kos i sar, 2013). Uzorkovano je 176 uzoraka mleka goveda, koza i magarica, kao i mleka žena. Od uzetih uzoraka kravljeg mleka (150), u čak 98,7 % je zabeleženo prisustvo AfM₁ a u 86 % uzoraka je prekoračena MDK vrednost koja je propisana u EU od 0,05 µg/kg. Drugih studija koje su se u Republici Srbiji bavile ispitivanjem sadržaja AfM₁ u mleku, prema našim saznanjima, nije bilo.

2.8 Pregled studija o kontaminaciji aflatoksinom B₁ u pojedinim zemljama

Sve do poslednjih nekoliko godina, kada su klimatske promene u vidu sve učestalijih toplih i sušnih leta počele da zahvataju i evropski kontinent, kontaminacija kukuruza na poljima plesnima iz roda *Aspergillus* se nije smatrala značajnijom, pa je pojava aflatoksina u Evropi bila vezana uglavnom za uvezene sirovine, namirnice i hranu za životinje, odnosno njene biljne komponente. Međutim, bilo je nekoliko zabeleženih slučajeva nakon toplih i sušnih leta gde su se stekli uslovi za masovniju pojavu infestacije kukuruza *Aspergillus* vrstama i viši nivo kontaminacije, u prvom redu AfB₁.

Tako je u Italiji između 1982 i 2007. godine u nizu studija analizirano ukupno 3607 uzoraka kukuruza (AA. VV, 2005; Battiliani i sar, 2008; Cinti i sar, 2005; Decastelli i sar, 2005; Micco i sar, 1986; Pietri i sar, 2004; Piva i sar, 2006; Reunerri, 2006). Najviši utvrđeni sadržaj AfB₁ bio je 233 µg/kg, objavljen u studijama iz 2004 i 2006, sa srednjim vrednostima od 21 i 14 µg/kg. Visoka kontaminacija AfB₁ je utvrđena i u studiji iz 2003 (Piva i sar, 2006), sa maksimalnom vrednošću od 155 µg/kg. U istoj studiji se navodi da je 2003. godina u Italiji bila veoma sušna, sa periodom bez padavina od maja do septembra.

Turska se, zahvaljujući svojoj mediteranskoj klimi, smatra jednom od zemalja gde postoje optimalni klimatski uslovi za razvoj aflatoksikogenih plesni. U periodu od 1986 do 2006. godine analizirano je ukupno 423 uzoraka kukuruza (Alperden i sar, 1990; Alptekin i sar, 2009; Giray i sar, 2009; Gursoy i Bicici, 2003; Nizamlyodlu i Oguz, 2003; Oruc i sar, 2006; Oruc i sar, 2007; Ozay i Heperkan, 1989). Najviši sadržaj AfB₁ zabeležen u uzorku kukuruza iznosio je 432 µg/kg u 2006. godini (Oruc i sar, 2007). Pored 2006 godine u kojoj je kontaminacija AfB₁ u Turskoj bila veoma visoka, u 2002. i 2005. godini bile su zabeležene najviše vrednosti nađenog AfB₁ i to 133 i 120 µg/kg pojedinačno (Giray et al, 2009; Nizamlyodlu i Oguz, 2003). Ove vrednosti su nađene u kukuruзу poreklom iz mediteranskog dela Turske.

Rumunija je još jedna evropska zemlja sa klimatskim predispozicijama za kontaminaciju kukuruza sa AfB₁, a istovremeno je i drugi po veličini proizvođač kukuruza u EU (EFSA, 2012). Ograničen broj studija govori da je od 95 uzoraka analiziranog kukuruza u periodu 1997. do 2004. godine (Braicu i sar, 2008; Curtui i sar, 1998; Tabuc i sar, 2009), najviša koncentracija AfB₁ zabeležena u studiji iz 2009. godine i iznosila je 46,4 µg/kg.

U studijama izvedenim u drugim evropskim zemljama: Francuskoj 1999. godine (Scudamore i Patel, 2000), Hrvatskoj 1979. godine (Pepeljnak i Blazer, 1982), Kipru 1997., 1998. i 2003 godine (Ionnou-Kakuori i sar, 2004), Češkoj,

Španiji i Portugalu 2008. godine (Monbaliu i sar, 2008), kao i u još jednoj studiji iz Španije (Munoz i sar, 1990), nije utvrđeno prisustvo AfB₁ u kukuruzu.

U Iranu, Karami-Osboo i sar. (2012) prijavljuju 146 pozitivnih uzoraka kukuruza na prisustvo AfB₁ od ukupno 373 uzoraka analiziranih tokom perioda 2006-2008. godine, što predstavlja 46,3 %. MDK vrednost za AfB₁ u kukuruzu iznosi 5 µg/kg u ovoj zemlji. Autori su zaključili da su nivoi kontaminacije kukuruza visoki, i da postoji značajan rizik po javno zdravlje.

Studija objavljena 2005. godine u Brazilu (Sassahara i sar, 2005), prijavljuje kontaminaciju 26% uzoraka hrane za životinje, i čak 53% uzoraka potpunih krmnih smeša. Uzorci su uzimani u periodu juli 2001. do novembar 2002. godine. Ukupno je bilo analizirano 98 uzoraka.

Veoma visoka kontaminacija kukuruza sa AfB₁ gajenog na srednjem zapadu SAD, naročito u državi Arkanzas zabeležena je 1998. Godine (Williams, 1999; Windham, 1999). Abbas i sar, 2006 su postavili studiju gde su eksperimentalno gajili više hibrida kukuruza uz adekvatne agrotehničke mere i pratili kontrolisane infestacije sa *A. flavus* plesni. Studija pokazuje da je 100% analiziranih uzoraka imalo sadržaj ukupnih aflatoksina preko maksimalno dozvoljene količine (20 µg/kg u SAD), a kontaminacija se kretala od 21 µg/kg do čak 699 µg/kg.

2.9 Pregled studija o kontaminaciji aflatoksinom M₁ u pojedinim zemljama

Iako je u dostupnoj naučnoj literaturi manje podataka o prisustvu AfM₁ u mleku u poređenju sa AfB₁ u kukuruzu, ipak postoji značajan broj studija koje pokazuju da prisustvo i količine AfM₁ u mleku krava predstavljaju direktnu posledicu prisustva AfB₁ u hrani za životinje. U skladu sa tim, naučno mišljenje EFSA panela za kontaminante hrane (EFSA, 2004) u svom delu o AfM₁ ističe zaključak da je u okviru zemalja Evropske unije prevalenca AfM₁ u mleku veoma

niska. Od svih prikupljenih podataka u periodu 1996.-2001. godine, odnosno 11831 uzoraka, broj uzoraka u kojima je sadržaj AfM₁ iznad propisane maksimalno dozvoljene količine (0,05 µg/kg), je iznosio samo 0,06%. Treba naglasiti i to da se većina ovih podataka odnosi na zbirne uzorke mleka gde treba imati u vidu efekat razblaženja.

Relevantne studije o ispitivanju sadržaja AfM₁ u mleku krava prikazane su zbirno u tabeli 2.

Tabela 2. Rezultati praćenja AfM₁ u zemljama EU (izvor: EFSA, 2004)

Zemlja	Godina	Br. uzoraka	Br. uzoraka sa farmi	Br. uzoraka manje od 0,01 µg/kg	Br. uzoraka od 0,01 do 0,05 µg/kg	Br. uzoraka veće od 0,05 µg/kg	Referenca
V. Britanija	2001	100	50	97	3	0	Food Standards Agency, 2001
Portugal	1999	102	31	43	57	2	Martins i Martins, 2000
Španija	2000/2001	92	92	89	3	0	Rodriguez i sar, 2003
Italija	1996	161	0	148	13	0	Galvano i sar, 2001
Grčka	1999/2000	166	52	92	71	3	Roussi i sar, 2002
Grčka	2000/2001	132	55	80	50	2	Roussi i sar, 2002
Nemačka	1999	6537	Nepoznato	6325	211	0	Podaci dobijeni od zemlje članice
Nemačka	2000	3618	0	3614	4	0	Bluthgen i Ubben, 2000
Kipar	1992-2003	270	Nepoznato	244	26	0	Ioannou i sar, 1999
Austrija	1999	20	Nepoznato	20	0	0	Podaci dobijeni od zemlje članice
Finska	1999	296	Nepoznato	295	1	0	Podaci dobijeni od zemlje članice
Francuska	1999	234	Nepoznato	234	0	0	Podaci dobijeni od zemlje članice
Irska	1999	62	Nepoznato	60	0	0	Podaci dobijeni od zemlje članice
Holandija	1999	30	Nepoznato	25	5	0	Podaci dobijeni od zemlje članice
Švedska	1999	11	Nepoznato	11	0	0	Podaci dobijeni od zemlje članice

Podaci sa individualnih farmi (280 uzoraka) ukazuju na veći stepen kontaminacije od 1,8%. Takođe je interesantno zapažanje da je incidenca pojave AfM₁ kao i nađene količine veća u mleku krmača nego u mleku krava. Ovo se objašnjava slabijom kontrolom potpunih smeša za ishranu svinja na bazi kukuruza u odnosu na striktniju kontrolu i niži MDK kod smeša za ishranu mlečnih krava (EFSA, 2004).

U izdvojenim studijama treba spomenuti studiju iz Slovenije (Godič-Tokar i sar, 2008) u kojoj je nađeno prisustvo AfM₁ u koncentraciji većoj od 0,05 µg/kg u 10% ispitivanih uzoraka mleka. Hrvatska studija (Bilandžić i sar, 2010) od ukupno analiziranog 61 uzorka mleka uzetih sa farmi, utvrđuje prekoračenje MDK u samo dva uzorka (58,6 i 58,7 ng/kg) ili 1,64% od ukupno analiziranih uzoraka. U Grčkoj, tokom 2009. i 2010. godine analizirano je 196 uzoraka mleka (Tsakiris i sar, 2013). AfM₁ je nađen u 46,5% uzoraka, ali su samo 2 uzorka sadržala AfM₁ iznad maksimalno dozvoljenih količina (MDK). Slični rezultati su dobijeni i u Turskoj (Gurbay i sar, 2006) gde je od 27 analiziranih uzoraka mleka uzetih sa tržišta u Ankari 59,3% sadržavalo AfM₁, ali u samo dva uzorka je nađeno prekoračenje MDK prema turskim propisima (50 ng/kg, odnosno 0,05 µg/kg). Sasvim drugačiju sliku daje druga turska studija (Unusan, 2006) izvedena iste godine na uzorcima mleka uzetih iz centralne Anatolije: od 129 uzoraka UHT mleka uzetog sa tržišta, 58,1% je bilo kontaminirano AfM₁, a čak 47% uzoraka je sadržavalo AfM₁ iznad MDK vrednosti. Srednja vrednost izmerenog AfM₁ u svim uzorcima bila je 108,17 ng/kg, dok je najviša vrednost izmerena u dva uzorka i prelazila je 500 ng/kg. U Maroku je sprovedena studija (Marnissi i sar, 2012) gde je od 48 uzoraka mleka, njih 13 (27%) bilo pozitivno na AfM₁, dok je u 4 uzorka (8%) zabeleženo više od 50 ng/kg. Pakistanska studija (Hussain i sar, 2008) saopštava rezultate od 52,5% kontaminiranog kravljeg mleka kao i 42,5% kontaminiranog mleka bivolice sa srednjim vrednostima od 44 ng/kg i 27 ng/kg. Ghanem i Orfi, 2009 prezentuju studiju izvedenu u Siriji na 126 uzoraka mleka (74 uzorka kravljeg, 23 uzorka ovčijeg, 11 uzoraka kozijeg, 10 uzoraka pasterizovanog kravljeg mleka i 8 uzoraka

mleka u prahu). U čak 80% ispitivanih uzoraka nađene su rezidue AfM₁ u rasponu od 20 do 765 ng/kg. Iransko istraživanje (Kamkar, 2005) sprovedeno na 111 uzoraka sirovog mleka iz grada Sarab beleži prisustvo AfM₁ u 76,6% uzoraka u opsegu koncentracija od 15 do 280 ng/kg, gde 40% ispitivanih uzoraka prelazi evropsku MDK vrednost. Druga iranska studija (Nemati i sar, 2010) saopštava rezultate 90 ispitanih uzoraka mleka uzetog iz maloprodaje u gradu Ardabilu. U svim ispitivanim uzorcima je utvrđeno prisustvo AfM₁, dok je kod 33% uzoraka nivo rezidua bio viši od 50 ng/kg. Vrednosti sadržaja AfM₁ su se kretale od 2,9 do 85 ng/kg.

AfM₁ se ne nalazi samo u mleku životinja, već se može naći i u mleku žena o čemu svedoče malobrojne studije. Tako Gurbay i sar, 2010 izveštavaju o rezultatima analize na prisustvo AfM₁ u mleku žena u Turskoj (Ankara) i saopštavaju nađene vrednosti od 60,90 do 299,99 ng/kg u svim uzorcima. El-Sayed i sar, 2002 su utvrdili srednju vrednost od 300 ng/kg u mleku žena u Egiptu.

2.10. Zakonska regulativa koja se odnosi na aflatoksin B₁ u hrani za životinje i aflatoksin M₁ u mleku

Imajući u vidu sve podatke iznete u prethodnim poglavljima, u pogledu štetnih efekata AfB₁ i AfM₁ na zdravlje ljudi i životinja, kao i široku rasprostranjenost ovih toksina, evidentna je potreba da se u cilju kontrole njihovog unosa uspostave odgovarajuće zakonske prepreke radi zaštite javnog zdravlja. Svetska zdravstvena organizacija je (između ostalih kontaminenata) okarakterisala kontaminaciju hrane i hrane za životinje mikotoksinima kao značajan izvor oboljenja koja se prenose putem hrane (WHO, 2002). U nekim delovima sveta, mikotoksini predstavljaju primarnu pretnju javnom zdravlju. Prikupljena saznanja o štetnim efektima mikotoksina tokom proteklih decenija rezultirala su uspostavljanjem maksimalno dozvoljenih količina (MDK) za mikotoksine u hrani i hrani za životinje u brojnim zemljama i/ili zajednicama zemalja.

Ekstenzivna studija koju je objavio FAO - "Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003" (FAO 2004) sumira zakonske propise koji su na snazi a odnose se na aflatoksine u hrani i hrani za životinje u većini zemalja sveta do 2003. godine.

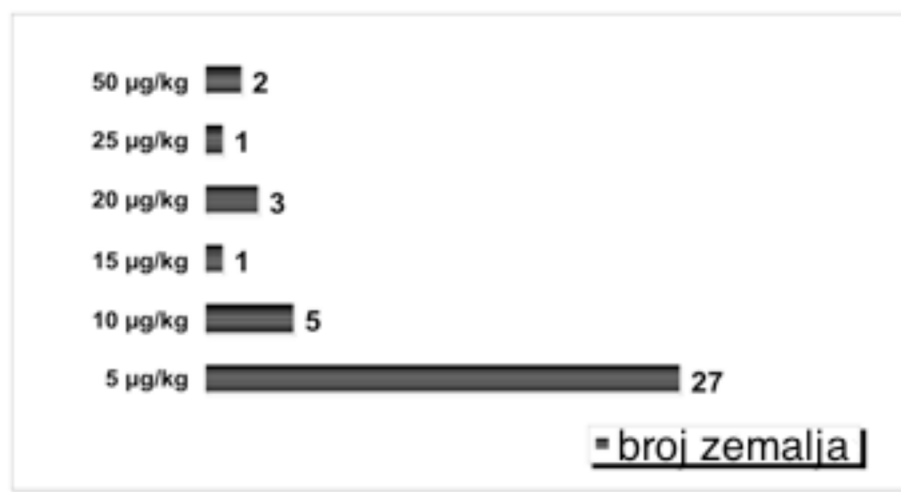
Prve MDK vrednosti za mikotoksine su propisane upravo za aflatoksine krajem 60-ih godina prošlog veka u razvijenim zemljama sveta, dok je do kraja 2003. godine, više od 100 zemalja usvojilo MDK vrednosti za mikotoksine u hrani i hrani za životinje, i ovaj broj je u konstantnom porastu (FAO, 2004). Brojni autori naučnih radova su svoja istraživanja posvetili upravo MDK vrednostima za mikotoksine (Krogh, 1977; Schuller i sar, 1983; Stoloff i sar, 1991; Gilbert, 1991; Resnik i sar, 1991; Van Egmond 1991; Van Egmond i Dekker, 1995; Boutrif i Canet, 1998; Rosner, 1998; Van Egmond, 1999). FAO je objavio dva pregledna rada u vidu monografija (FAO, 1997; FAO, 2004) sumirajući MDK vrednosti u pojedinim zemljama sveta, a poslednja monografija daje presek stanja zaključno sa 31. decembrom 2003. godine.

Treba naglasiti da se, pored samih MDK vrednosti, velika pažnja posvećuje i procedurama uzorkovanja, imajući u vidu veoma heterogenu distribuciju mikotoksina u okviru jedne proizvodne partije, naročito u pojedinim proizvodima (sušene smokve, kikiriki). Iz ovog razloga, kodifikacija procedura uzorkovanja je predmet velikog interesovanja (FAO, 1993; CAC, 2000). U Evropskoj uniji, propis kojim se propisuju metode uzorkovanja i analize za potrebe službene kontrole nivoa mikotoksina u namirnicama je na snazi od 2006. godine, sa izmenama i dopunama iz 2010. godine (EC 401/2006; EC 178/2010).

Prema monografiji FAO (FAO, 2004), od 1995. do 2003. godine, broj zemalja koje imaju na snazi propise o MDK vrednostima za mikotoksine je porastao za 30% i obuhvata zemlje u kojima živi 87% svetske populacije. Na evropskom kontinentu, sve zemlje imaju na snazi neku vrstu propisa koja reguliše maksimalno dozvoljene

količine pojedinih mikotoksina.

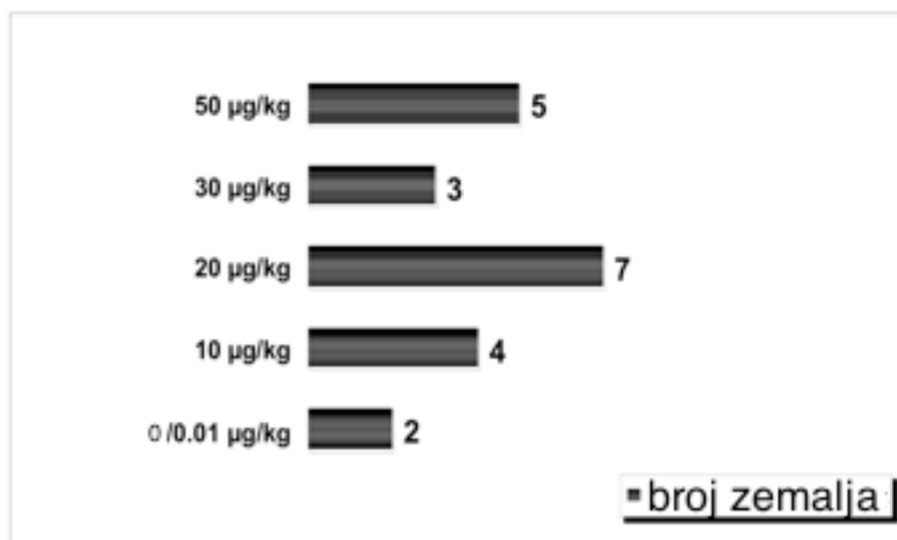
Mnoge zemlje poseduju regulativu koja propisuje MDK vrednosti za AfB₁ u hrani za životinje. Poznato je da je najefikasniji način kontrole pojave AfM₁ u mleku limitiranje količina AfB₁ u potpunim smešama za mlečne krave. Grafikon 3 prikazuje broj zemalja koje imaju na snazi ovakav propis i MDK vrednosti.



Grafikon 3. Broj zemalja u svetu sa MDK vrednostima za AfB₁ u potpunim smešama za ishranu mlečnih krava (izvor: FAO, 2004)

Sa slike se vidi da najveći broj zemalja primenjuje MDK od 5 µg/kg, i odnosi se na zemlje Evropske unije, kao i zemlje članice EFTA (engl: European free trade association) sporazuma. Ovakav propis se primenjuje u zemljama u kojima je MDK vrednost za AfM₁ u mleku postavljena na 0,05 µg/kg. Direktiva EU 2002/32/EC propisuje ove vrednosti, kao i MDK od 20 µg/kg za AfB₁ u kukuruzu.

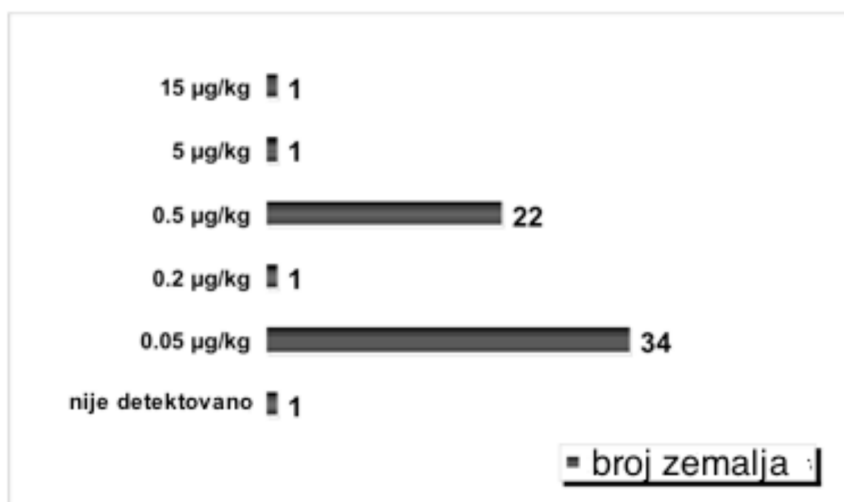
Grafikon 4 prikazuje broj zemalja i MDK vrednosti za ukupne aflatoksine u hranivima. Sa slike se vidi da najveći broj zemalja primenjuje MDK vrednost od 20 µg/kg. Ove vrednosti se mogu naći u zemljama širom sveta ali su najčešće prisutne u zemljama severne i južne Amerike.



Grafikon 4. Broj zemalja u svetu sa MDK vrednostima za ukupne aflatoksine u hranivima (izvor: FAO, 2004)

Propisi koji regulišu MDK vrednosti za AfM₁ postoje u 60 zemalja prema dostupnim podacima zaključno sa 2004. godinom (FAO, 2004). Zemlje Evropske unije primenjuju MDK od 0,05 µg/kg. Neke zemlje u Africi, Aziji i Latinskoj Americi takođe predlažu ovu MDK vrednost. Vrednost od 0,05 µg/kg usvojena je prvi put od strane Evropske unije 2003. godine (Commission Regulation 2003/2174/EC) među najnižima je u svetu i zasnovana je na "ALARA" principu (engl: **As Low As Reasonably Achievable** – što niže koliko je to razumno moguće postići) (EFSA, 2004).

Nasuprot ovome, neke zemlje u Evropi, Sjedinjene Američke Države i nekoliko azijskih zemalja primenjuje MDK vrednost od 0,5 µg/kg kao i zemlje Latinske Amerike članice MERCOSUR alijanse (Argentina, Brazil, Paragvaj, Urugvaj, Venecuela, Bolivija) (EFSA, 2004). MDK vrednost od 0,5 µg/kg je predložena i od strane Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2001). Grafikon 5 prikazuje MDK vrednosti za AfM₁ u mleku na svetskom nivou i broj zemalja primenjuju ove vrednosti.



Grafikon 5. MDK vrednosti za AfM₁ i broj zemalja koje ih primenjuju (izvor: FAO, 2004)

U Republici Srbiji, propis koji reguliše MDK vrednost za AfB₁ u hrani za životinje je “Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje” (Sl. glasnik RS broj 4/10 sa dopunama, Sl. glasnik RS broj 28/2011). Prema ovom Pravilniku aflatoksini su regulisani kao ukupni (AfB₁, AfB₂, AfG₁ i AfG₂), i MDK vrednost u hranivima iznosi 50 µg/kg. Potpune i dopunske smeše za mlečne krave ne smeju da sadrže više od 10 µg/kg ukupnih aflatoksina.

Maksimalno dozvoljenu količinu aflatoksina M₁ u Republici Srbiji je od maja 1992. godine do marta 2013. godine regulisao “Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama (Sl. list SRJ broj 5/92 sa ispravkama Sl. list SRJ broj 11/92)”, koji je propisivao MDK vrednost od 0,5 µg/kg AfM₁ u mleku i mlečnim proizvodima. U 2011. godini na snagu je stupio “Pravilnik o dopuni Pravilnika o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja” (Sl. glasnik RS broj 28/11). Prema ovom Pravilniku, MDK vrednost za sirovo mleko, termički obrađeno mleko i mleko za proizvodnju mlečnih proizvoda iznosila je

0,05 µg/kg i bila je usklađena sa MDK vrednosti koja se primenjuje u Evropskoj uniji. U januaru 2013. godine je u Srbiji zabeležen porast koncentracije AfM₁ u mleku, nastala usled povećanih vrednosti AfB₁ u kukuruzu nakon jedne od najvećih suša koja je pogodila čitavo područje naše zemlje. Masovnost pojave i izmerene količine AfM₁ koje su prelazile propisanu MDK vrednost, uticale su da u martu 2013. godine, Vlada Republike Srbije izmeni vrednost MDK od 0,05 µg/kg i ponovo uvede staru MDK vrednost od 0,5 µg/kg (Sl. glasnik RS broj 20/2013).

2.11 Analitičke metode za određivanje aflatoksina B₁ i aflatoksina M₁

U prethodnim poglavljima prikazan je samo deo višedecenijskih napora naučne zajednice i regulatornih tela nacionalnog i nadnacionalnog karaktera, za utvrđivanje maksimalno dozvoljenih količina AfB₁ i AfM₁ u cilju zaštite zdravlja ljudi i životinja. Međutim, bez obzira na adekvatnu naučnu zasnovanost i obrazloženja regulatornih tela za donošenje MDK vrednosti, kontrola njihovog poštovanja ne bi bila moguća bez paralelnog razvoja analitičkih metoda u okviru različitih analitičkih tehnika, a u cilju dobijanja pouzdanih rezultata.

Analitička metodologija za kvalitativno i kvantitativno dokazivanje aflatoksina predstavlja posebnu naučnu oblast koja, zbog prirode i kompleksnosti problema, zahteva multidisciplinarni pristup i izuzetno veliku posvećenost naučne zajednice koja se bavi ovom problematikom. Pre nego što prikažemo pregled relevantne literature iz ove oblasti, treba se osvrnuti na dva fundamentalna problema inherentna aflatoksinima.

U prethodnom izlaganju je na više mesta naglašeno da su osnovni izvor AfB₁ u hrani za životinje kontaminirane žitarice (u prvom redu kukuruz) i da kontaminacija može biti primarna i sekundarna (kontaminacija u polju tokom rasta biljke i tokom skladištenja u silosima). Međutim, rast plesni, a samim tim i

produkcija AfB₁ se odvija krajnje neravnomerno u polju odnosno silosu (Commission Regulation EC 401/2006/EC), što je i razlog velikih varijacija u sadržaju AfB₁ u istoj proizvodnoj partiji. Stepenn variranja sadržaja AfB₁ može da bude (i uglavnom i jeste) toliko veliki da ponovljena ispitivanja jednog uzorka kukuruza mase 100-200 g mogu da daju rezultate od negativnih (ispod limita detekcije metode) do visoko kontaminiranih, nekoliko puta iznad propisane MDK vrednosti. Brojni autori ukazuju na ovaj problem (Whittaker, 2003; 2006, Bryden, 2012), i smatraju da najveći izvor greške u analizi mikotoksina uopšte leži u teškoćama vezanim za pribavljanje reprezentativnog uzorka. Neadekvatna uniformnost sadržaja aflatoksina u biljnom materijalu je odavno poznata i veoma dobro ilustrovana u radu Hamiltona (1978) koji je analizirao hranu za životinje uzetu sa različitih mesta u samo jednom silosu.

Tabela 3. Neravnomerna distribucija aflatoksina u silosu za skladištenje hrane za životinje (izvor: Hamilton, 1978)

Uzorak br.	Mesto uzimanja uzorka	Af (µg/kg)
1	Periferija silosa	120
2	Periferija silosa	350
3	Centar silosa	35
4	Centar silosa	<20
5	Centar silosa	<20
6	Centar silosa	<20

Tabela jasno pokazuje varijacije u sadržaju aflatoksina koje su do te mere velike da analizom samo jednog od ovih šest uzoraka nije moguće dati adekvatnu informaciju o ispravnosti date hrane za životinje. Imajući u vidu da je u gotovo svim zemljama sadržaj aflatoksina u hrani za životinje zakonom regulisana kategorija, postaje jasno kakve zakonske i zdravstvene implikacije neadekvatno uzorkovanje nosi sa sobom.

Stoga je neophodno posvetiti veliku pažnju samom procesu uzorkovanja i kodifikovati ga u cilju dobijanja reprezentativnog uzorka. Evropska unija je 2006. godine donela Pravilnik o metodama uzorkovanja i analize mikotoksina u svrhe službene kontrole (Commission Regulation EC 401/2006), gde se navodi način uzorkovanja pojedinih vrsta hrane i hrane za životinje, kao i količina reprezentativnog uzorka potrebnog za analizu. Pravilnik propisuje način uzorkovanja i uvodi pojmove pojedinačnog uzorka i zbirnog uzorka koji se sastoji od pojedinačnih i dalje se homogenizuje u laboratoriji radi dobijanja konačnog uzorka za analizu. Broj i masa uzetih uzoraka zavise od veličine proizvodne partije (lot) iz koje se uzima uzorak. Za male proizvodne partije, odnosno male količine uzorka može se uzeti 3-100 pojedinačnih uzoraka ukupne mase 1-10 kg.

Sa druge strane, AfM₁ predstavlja metabolit AfB₁ koji se nalazi u mleku i njegova distribucija u mleku jedne životinje je ravnomerna. Međutim, u lancu proizvodnje i prerade mleka (otkup sa farmi ili od individualnih proizvođača, mešanje mleka različitog porekla u cisternama) neminovno dolazi do variranja u sadržaju AfM₁. Ove varijacije postaju još manje predvidljive kada se ima u vidu da i u ishrani mlečnih krava sa jedne farme postoji različita zastupljenost AfB₁ usled njegove neravnomerne zastupljenosti u kukuruzu. Stoga i uzorkovanje mleka mora da se odvija na način da se obezbedi reprezentativnost uzorka, što je i sadržano u EU propisu u vidu propisanih količina mleka koje mora da se uzme za jednu analitičku partiju. Pravilnik EU broj 401/2006/EC propisuje minimalan broj pojedinačnih uzoraka i minimalnu masu zbirnog uzorka za određivanje AfM₁ u mleku.

U oba slučaja (kukuruz ili mleko), obavezna je što bolja homogenizacija dobijenog zbirnog uzorka (na mestu uzorkovanja ili u laboratoriji, u zavisnosti od raspoloživosti opreme).

Drugi izazov sa kojim se treba suočiti kod određivanja aflatoksina jeste njihova niska koncentracija u uzorku. Na osnovu podataka iznetih ranije u ovom

pregledu o zastupljenosti AFB₁ i AfM₁ u kukuruzu i mleku, može se zaključiti da se AFB₁ u žitaricama nalazi u najvećem broju slučajeva u koncentracijama do nekoliko desetina µg/kg, dok se kod AfM₁ u mleku radi o hiljadu puta manjoj koncentraciji. U oba slučaja se radi o kompleksnim organskim uzorcima (kukuruz, mleko) koji sadrže veliki broj prirodnih sastojaka hrane (proteini, masti, ugljeni hidrati, enzimi...), i veoma malu količinu toksina. Ovo praktično znači da je potrebno razviti analitičku metodologiju koja je u stanju da identifikuje i kvantifikuje količine od 10⁻¹⁰ do čak 10⁻¹³ g AFB₁ i AfM₁ u vrlo kompleksnim matriksima ako se radi o uzorcima koji toksine sadrže na nivou propisanih MDK vrednosti.

Analitičke metode za određivanje aflatoksina se mogu podeliti na dve grupe: trijažne (engl. screening) i potvrđujuće ili konfirmatorne (engl. confirmatory). Trijažne metode se koriste za detekciju prisustva supstance na nivou od interesa (Commission Decision 2002/657/EC) i karakterišu se velikom propustnom moći (velikim brojem uzoraka koje je moguće obraditi u kratkom vremenskom periodu), a dizajnirane su tako da ne daju lažno negativne rezultate, dok su lažno pozitivni rezultati mogući. U ove metode uglavnom spadaju brojni imunoenzimski (ELISA) testovi (Stroka i Anklam, 2002). ELISA metode kombinuju visoku osetljivost biohemijskih enzimskih reakcija sa specifičnošću imunoloških reakcija (Syndenham i Shepard, 1996). Osetljivost ELISA metoda u današnje vreme dostiže i 0,005 µg/kg (Wang i sar, 2012) što je daleko ispod najniže MDK vrednosti za AfM₁ od 0,05 µg/kg u mleku. Isto se može reći i za metode za detekciju AFB₁ u kukuruzu. Ipak, njihova specifičnost i selektivnost nisu apsolutne, što može dovesti do unakrsnih reakcija sa molekulima koji sadrže iste ili slične haptenske grupe koje omogućuju imunološku reakciju (Kim i sar, 2000; Rodriguez-Velasco, 2003). Sa druge strane, ELISA metode su brze, jednostavne za izvođenje, osetljive i dovoljno specifične tako da danas predstavljaju najčešći put za brzu analizu sadržaja aflatoksina u hrani i hrani za životinje (Magliulo i sar, 2005; Micheli i sar, 2005; Stroka i Anklam, 2002; Thirumala-Devi i sar, 2002; Van Egmond, 2004).

Eventualno pozitivni nalaz korišćenjem ELISA metode se može naknadno potvrditi korišćenjem drugih analitičkih tehnika (Markaki i Melissari, 1997).

Drugu grupu metoda čine konfirmatorne metode. Ove metode treba da obezbede informacije o supstanci koje će omogućiti njenu nedvosmislenu identifikaciju i kvantifikaciju (Commission Decision 2002/657/EC). Prema važećim propisima u EU, konfirmatorna metoda se zasniva na detekciji supstance od interesa koja treba da pruži informaciju o hemijskoj strukturi analita, a kojoj obavezno prethodni hromatografska separacija komponenti uzorka. Separacione (hromatografske) tehnike za analizu AfB₁ i AfM₁ se mogu podeliti na:

- Hromatografiju na tankom sloju (TLC – engl. Thin Layer Chromatography) i hromatografiju na tankom sloju visokih performansi (HPTLC – engl. High Performance Thin Layer Chromatography) sa fluorescentnom detekcijom;
- Tečnu hromatografiju visokih performansi (HPLC – engl. High Performance Liquid Chromatography) sa ultraljubičastom ili fluorescentnom detekcijom);
- Tečnu hromatografiju visokih performansi sa maseno spektrometrijskom detekcijom (LC-MS/MS – engl. High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry) i tečnu hromatografiju ultra visokih performansi sa maseno spektrometrijskom detekcijom (UPLC (UHPLC)-MS/MS – engl. Ultra High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry).

Postoje i druge analitičke tehnike koje se zasnivaju na hromatografiji kojima se mogu dokazivati aflatoksini (gasna hromatografija, tečna hromatografija sa UV detekcijom...), međutim zbog komplikovane pripreme uzoraka i/ili slabe osetljivosti, nisu našle mesto u rutinskoj praksi.

Hromatografija na tankom sloju je prva tehnika korišćena za najpre kvalitativno a potom i kvantitativno određivanje AfB₁ i (u manjoj meri) AfM₁.

Danas uglavnom ima istorijski značaj u razvijenim zemljama, iako se još uvek zadržala u zemljama u razvoju zahvaljujući svojim prednostima kao što su relativna lakoća izvođenja i srazmerno tome prihvatljiva cena, kao i mogućnošću analiziranja više uzoraka u jednoj analitičkoj partiji (Stroka i Anklam, 2002). Jedna od mana ove metode je upotreba većih količina hlorovanih organskih rastvarača sa mogućim negativnim posledicama po analitičare i životnu sredinu, kao i relativno slaba osetljivost. Krajem XX veka je razvijena i modifikovana TLC metoda koja isključuje upotrebu organohalogenih rastvarača, ali sa druge strane zahteva upotrebu imunoafinitetnih kolona za prečišćavanje uzoraka što značajno utiče na cenu izvođenja analize (Stroka i sar, 2000).

Razvoj HPLC metoda početkom '80-ih godina prošlog veka zahvaljujući napretku ove analitičke tehnike i sve široj dostupnosti instrumentacije za njeno izvođenje, značajno utiče na porast broja dostupnih metoda za kvantitativno određivanje AfB₁ i AfM₁ (Zolner i sar, 2006). U okviru poglavlja o hemijskim osobinama AfB₁ i AfM₁, rečeno je da ovi molekuli poseduju sposobnost native fluorescencije. Daljom derivatizacijom sa jedinjenjima halogenih elemenata (jodom ili bromom) intenzitet fluorescencije se značajno povećava čime je omogućena detekcija do nivoa od 10⁻¹² g toksina (ng/kg) što zadovoljava sve regulatorne zahteve u pogledu MDK vrednosti (Papp i sar, 2002). Sa druge strane, sve metode zasnovane na HPLC sa fluorescentnom detekcijom zahtevaju prečišćavanje uzoraka imunoafinitetnim kolonama što utiče na brzinu izvođenja i cenu analize (Beltran i sar, 2011). Međutim, može se zaključiti da je ova analitička tehnika dovoljno dugo u upotrebi i samim tim metode zasnovane na njoj mogu da zadovolje kako analitičke tako i regulatorne kriterijume koji se danas primenjuju (Jaimez i sar, 2000; Sizoo i van Egmond, 2005).

U poslednjoj deceniji, tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) postaje tehnika izbora za određivanje mikotoksina uopšte pa i aflatoksina u hrani i hrani za životinje (Krska i sar, 2006; Zollner i sar, 2006). Gotovo apsolutna specifičnost i selektivnost koju pruža maseni spektrometar

kvadrupolnog tipa u MRM načinu rada (engl. **M**ultiple **R**eaction **M**onitoring – praćenje višestrukih reakcija) preko merenja prisustva i intenziteta jona celih molekula i njihovih fragmenata, postaje tehnika izbora za kvantitativno određivanje najvećeg broja rezidua i kontaminenata u organskim matriksima (Beltran i sar, 2011). Mnogi autori prijavljuju metode za određivanje AFB₁ i AfM₁ u kukuruzu i mleku zasnovane na LC-MS/MS tehnici koje zaobilaze korak prečišćavanja uzoraka i sastoje se od analiziranja sirovih ekstrakata hrane i hrane za životinje u nekom organskom rastvaraču (Bertran i sar, 2009; Demulle i sar, 2006; Frenich i sar, 2009; Herebian i sar, 2009; Spanjer i sar, 2008; Sulyok i sar, 2006; Sulyok i sar, 2009). Navedeni pristup je moguć zahvaljujući sposobnosti ovakvog tipa detektora da razlikuje jedinjenja na osnovu njihovih masa i samim tim otkloni interferirajuće supstance prisutne u uzorku što druge vrste detekcije nisu u stanju. Prednosti ovakvog pristupa su zanemarljiv gubitak analita tokom pripreme uzorka te visok prinos metode, redukovanje upotrebe rastvarača i hemikalija na minimum i značajno povećavanje brzine i propustne moći metode (Beltran i sar, 2009). Međutim, ovakav pristup nije bio moguć kod određivanja AfM₁ u hrani za decu gde je MDK vrednost u EU propisana na 0,025 µg/kg (Commission Regulation (EU) 165/2010) i predstavlja, izuzimajući dioksine, najnižu MDK vrednost za neki kontaminant ili reziduu uopšte (Beltran i sar, 2009, Spanjer i sar, 2008).

Razvoj i sve šira dostupnost tečne hromatografije ultra visokih performansi (UPLC) kuplovane sa masenom spektrometrijom (UPLC-MS/MS) dozvoljava brže hromatografske separacije što rezultira kraćim vremenom analize (Di Mavungu i sar, 2009; Freinch i sar, 2009). Istovremeno, separacija postaje efikasnija što direktno utiče na oštrinu i visinu pika sa posledičnim povećanjem osetljivosti i nižim limitima detekcije i kvantifikacije (Fu i sar, 2008; Ren i sar 2007; Ventura i sar, 2006; Beltran i sar, 2011).

Jedan od najkompletnijih zakonskih propisa iz oblasti zahteva za kriterijume analitičkih metoda jeste dokument EU „Odluka Komisije od 12. Avgusta

2002. godine za implementaciju Direktive Saveta 96/23/EC u pogledu performansi analitičkih metoda i interpretaciji rezultata" (2002/657/EC). Iako se ovim propisom regulišu zahtevi za metode koje se primenjuju u okviru Nacionalnih programa praćenja rezidua i kontaminenata (Nacionalni monitoring programi), on može da predstavlja univerzalnu osnovu za definisanje performansi analitičkih metoda iz više oblasti. Metode za određivanje AfB₁ i AfM₁ donekle spadaju u korpus metoda koje reguliše Direktiva 2002/657/EC i to u pogledu samog procesa validacije, U zemljama članicama EU obavezna je validacija metoda shodno kriterijumima iz ovog dokumenta.

Numerički kriterijumi koje analitičke metode za AfB₁ i AfM₁ treba da ispune sadržani su u „Pravilniku Komisije EC 401/2006. Tabela 4 sumira zahteve ovog dokumenta u delu za analitičke metode.

Tabela 4. Kriterijumi za analitičke metode za određivanje AfB₁ i AfM₁ (izvor: 401/2006/EC)

Kriterijum	Opseg koncentracija	Preporučena vrednost	Maksimalno dozvoljena vrednost
Slepa proba	Svi opsezi	Zanemarljiva	-
prinos AfM₁	0,01-0,05 µg/kg	60-120%	
	>0,05 µg/kg	70-110%	
prinos AfB₁	<1 µg/kg	50-120%	
	1-10 µg/kg	70-110%	
	>10 µg/kg	80-110%	
Preciznost u uslovima reproducibilnosti (RSD_R)		Prema rezultatu Horovicove jednačine $RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)}$	2* RSD _R

Treba naglasiti i da se u tabeli ne navodi limit detekcije imajući u vidu da se svi kriterijumi formiraju na tačno određenim nivoima koji proističu iz MDK vrednosti. Vrednost „C” u Horovicovoj jednačini predstavlja odnos masenog udela aflatoksina u uzorku (npr. za koncentraciju od 100% - 100 g u 100 g, ova vrednost je 1 dok za koncentraciju od 1 µg/kg, ova vrednost je 10⁻⁹ odnosno 0,000000001).

Pored navedenih kriterijuma, merna nesigurnost (u), odnosno proširena merna nesigurnost (U) je jedan od parametara čije je utvrđivanje obavezno pri validaciji analitičkih metoda za Afb₁ i AfM₁. Merna nesigurnost se definiše kao uvek pozitivna vrednost koja se dodeljuje merenoj vrednosti i karakteriše njenu disperziju (EURACHEM, 1995). Prema Pravilniku 401/2006/EC, merna nesigurnost se izvodi prema sledećoj formuli:

$$Uf^2 = (LoD/2)^2 + (\alpha * C)^2$$

LoD predstavlja limit detekcije metode, „C” predstavlja maseni udeo dos vrednost „ α ” zavisi od koncentracije na kojoj se metoda validuje. Ove vrednosti su date u tabeli 5.

Tabela 5. Vrednosti „ α ” u zavisnosti od koncentracije Afb₁ i AfM₁ (preuzeto iz 401/2006/EC)

Koncentracija ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	α
<50	0,2
51-500	0,18
501-1000	0,15
1001-10000	0,12
>10000	0,1

3. CILJ I ZADATAK

Imajući u vidu iznete podatke iz literature, cilj rada je:

1. Da se omogući detaljni uvid u obim i tok kontaminacije kukuruza kao sirovine za proizvodnju hrane za životinje sa AfB₁, na teritoriji Republike Srbije tokom njegove masovne pojave a nakon ekstremne suše koja je zemlju pogodila u leto 2012. godine;
2. Da se omogući detaljan uvid u obim i tok posledične pojave rezidua AfM₁ u mleku na teritoriji Republike Srbije tokom 2013. godine;
3. Da se radi poboljšanja analitičkih kapaciteta i dobijanja pouzdanih rezultata, razviju, validuju i u rutinsku upotrebu uvedu konfirmatorne metode za određivanje AfB₁ i AfM₁ koristeći UPLC-MS/MS analitičku tehniku;

Polazeći od pretpostavke da se samo realnim sagledavanjem obima i intenziteta pojave AfB₁ u kukuruza i posledično AfM₁ u mleku, mogu doneti efikasne mere u cilju sprečavanja ili smanjenja štete nastale budućim pojavama AfB₁ i AfM₁, kao i u cilju očuvanja zdravlja životinja i ljudi, zadaci istraživanja ove doktorske disertacije su:

1. Da se izvrši uzorkovanje reprezentativnog broja uzoraka kukuruza i sirovog, pasterizovanog i sterilizovanog mleka na teritoriji Republike Srbije

- radi analiziranja sadržaja AfB₁ i AfM₁. Analize će se izvoditi primenom prethodno validovanih ELISA protokola koji se već rutinski koriste;
2. Da se rezultati dobijeni analiziranjem uzoraka kukuruza na AfB₁ i sirovog, odnosno termički tretiranog mleka na AfM₁ tokom više od 6 meseci na teritoriji cele zemlje detaljno statistički obrade u cilju dobijanja naučno validnih podataka o toku i ishodu pojave AfB₁ i AfM₁ u Republici Srbiji;
 3. Da se obavi poređenje distribucije AfB₁ i AfM₁ u različitim regionima Republike Srbije, kao i promene intenziteta kontaminacije i prisustva rezidua tokom vremena na osnovu polugodišnjeg praćenja koncentracija ovih jedinjenja u kukuruzu i mleku;
 4. Da se razviju i validuju pouzdane konfirmatorne analitičke metode za kvantitativno određivanje AfB₁ u kukuruzu i AfM₁ u mleku zasnovane na UPLC-MS/MS tehnici prema kriterijumima i na nivoima (MDK) koji su važeći u EU;
 5. Da se određeni broj identičnih uzoraka kukuruza i mleka analizira na prisustvo AfB₁ i AfM₁ koristeći obe metode (ELISA i UPLC-MS/MS) paralelno, radi utvrđivanja nivoa korelacije između performansi dve različite analitičke tehnike;

4. MATERIJAL I METODE

Prilikom postavljanja plana rada i izbora metoda, uzeti su u obzir cilj i zadatak rada, kao i relevantni literaturni podaci o nacionalnoj i međunarodnoj zakonskoj regulativi vezanoj za AfB₁ i AfM₁, kao i o zahtevima koji se odnose na uzorkovanje i performanse analitičkih metoda.

Radi bolje preglednosti, ovo poglavlje će biti podeljeno na segmente i obuhvatiće proceduru uzimanja uzoraka kukuruza i mleka za ispitivanja, opis ELISA metoda za određivanje AfB₁ i AfM₁, opis UPLC-MS/MS metoda za određivanje AfB₁ i AfM₁, postupak validacije UPLC-MS/MS metoda, kao i opis statističkih metoda korišćenih za interpretaciju rezultata.

4.1. Uzorkovanje kukuruza i mleka

Uzorkovanje merkantilnog kukuruza u zrnu namenjenog pripremi hrane za životinje sprovedeno je od 05.11.2012. godine do 18.03.2013. godine. Sve vreme za koje su uzimani uzorci je podeljeno na dva dela zbog preglednijeg prikazivanja i obrade rezultata (1. i 2. period uzorkovanja). Prvi period je obuhvatao uzorke uzete od 05.11.2012. godine do 20.01.2013. godine (196 uzoraka) dok je drugi period započeo 21.01.2013. godine i završio se 18.03.2013. godine (484 uzoraka). Razlog za dvostruko više uzoraka uzetih u drugom u odnosu na prvi period je što je su tek polovinom januara 2013. godine postale evidentne razmere kontaminacije

mleka AfM₁, te je tada odlučeno da se eksperiment proširi i u obzir uzme veći broj uzoraka kukuruza. Uzorci su uzimani sa farmi mlečnih krava, iz silosa i od individualnih proizvođača hrane za životinje kao i sa individualnih gazdinstava u Republici Srbiji bez AP Kosovo i Metohija. Ukupno je uzeto 680 uzoraka kukuruza iz 23 upravna okruga Republike. Zbog činjenice da je broj uzoraka značajno varirao po okruzima (neravnomerno raspoređeni proizvodni i skladišni kapaciteti), odlučeno je da se sistematizovanje i grupisanje uzoraka, umesto po okruzima, obavi na način da su formirane 3 „regije” (vojvođanska, beogradska i centralna Srbija). Treba naglasiti da pojam „regije” nije povezan sa zvaničnom teritorijalnom podelom koja je propisana u Uredbi o nomenklaturi statističkih teritorijalnih jedinica (Sl. Glasnik RS br. 109/09 i 45/10), već je uveden samo u svrhe jasnijeg prikazivanja i obrade dobijenih rezultata u ovoj disertaciji. Na ovaj način je postignuta približna ravnomernost raspodele i samim tim je poređenje rezultata značajno olakšano sa aspekta statističke obrade. Odluka da se na ovaj način izvrši geografska podela je posledica kompromisa između broja stanovnika koji naseljavaju ovako formirane geografske celine (1.647.490 stanovnika u beogradskoj regiji; 1.945.780 stanovnika u vojvođanskoj regiji i 3.665.483 stanovnika u centralnoj Srbiji), i značajno veće koncentracije poljoprivredne proizvodnje u prve dve regije, naročito u AP Vojvodina, u odnosu na treću (republički Zavod za statistiku, 2012).



Slika 13. Karta Republike Srbije sa administrativnom podelom po upravnim okruzima (izvor: republički Zavod za statistiku)

Pravilnik EU propisuje način uzorkovanja i uvodi pojmove pojedinačnog uzorka i zbirnog uzorka koji se sastoji od pojedinačnih i dalje se homogenizuje u laboratoriji radi dobijanja konačnog uzorka za analizu. Broj i masa uzetih uzoraka zavise od veličine proizvodne partije (lot) iz koje se uzima uzorak.

Tabela 6. minimalan broj pojedinačnih uzoraka i minimalna masa zbirnog uzorka za određivanje AfB₁ u kukuruзу (izvor: 401/2006/EC).

Masa proizvodne partije (t)	Broj pojedinačnih uzoraka	Masa zbirnog uzorka (kg)
<0,05	3	1
0,05-0,5	5	1
0,5-1	10	1
1-3	20	2
3-10	40	4
10-20	60	6
20-50	100	10

Ovo praktično znači da ukoliko je proizvodna partija kukuruza iz koje se uzimao uzorak za analizu imala masu od 10 t, uzeto je 60 puta po 100 g uzorka na različitim mestima u skladištu, da bi konačna masa uzorka iznosila 6 kg.

Svi uzorci kukuruza u zrnu su samleveni u mlinu čekićaru proizvođača Sever (Subotica, Srbija), model „Ideal 70”. Nakon mlevenja svakog uzorka kroz mlin je propuštan oko 5 kg kukuruza koji ne sadrži AfB₁ (odsustvo toksina je prethodno utvrđeno ELISA metodom), radi izbegavanja unakrsne kontaminacije uzoraka. Oko 500 g ovako samlevenog kukuruza upakovano je u polietilenske providne kese, obeleženo i čuvano na sobnoj temperaturi zaštićeno od svetlosti do izvođenja analize.

Uzorkovanje sirovog i termički tretiranog (pasterizovanog, sterilizovanog) mleka, sprovedeno je od 04.02.2013. godine do 16.06.2013. godine. Uzorci mleka uzorkovani su u 24 upravna okruga Republike Srbije bez AP Kosovo i Metohija, i to

sa farmi mlečnih krava, iz mlekara, od individualnih proizvođača i iz prometa. Vreme za koje je obavljeno uzorkovanje je podeljeno na tri dela radi preglednijeg prikazivanja i obrade rezultata (1. 2. i 3. period uzorkovanja). Prvi period je obuhvatao uzorke uzete od 04.02.2013. godine do 24.03.2013. godine (2.404 uzorka), drugi period je započeo 25.03.2013. godine i završio se 05.05.2013. godine (2.832 uzorka) i treći period trajao je od 06.05.2013. godine do 16.06.2013. godine (1.389 uzorka). Ukupno je analizirano 6.625 uzoraka mleka.

Proces uzorkovanja je u pogledu načina i količine uzetih uzoraka bio sproveden u skladu sa Pravilnikom EU 401/2006. radi obezbeđenja njihove reprezentativnosti. Minimalan broj pojedinačnih uzoraka mleka, kao i minimalne mase zbirnog uzorka koji se dobija iz više pojedinačnih prikazani su u tabeli 7.

Tabela 7. Minimalan broj pojedinačnih uzoraka i minimalna masa zbirnog uzorka za određivanje AfM₁ u mleku (izvor: 401/2006/EC).

Oblik pakovanja	Zapremina ili masa proizvodne partije (L ili kg)	Broj pojedinačnih uzoraka	Masa zbirnog uzorka (kg)
Rinfuz (cisterna)	-	3-5	1
Boce ili druga pakovanja	<=50	3	1
Boce ili druga pakovanja	50-500	5	1
Boce ili druga pakovanja	>500	10	1

Tabela 8 prikazuje broj uzoraka kukuruza i mleka po upravnim okruzima i regijama.

Regija	Upravni okrug	Broj uzoraka kukuruz	Broj uzoraka mleko
Vojvodanska	Zapadnobački	48	884
	Severnobački	28	600
	Severnobanatski	10	80
	Južnobački	73	209
	Srednjobanatski	85	68
	Sremski	91	77
	Južnobanatski	99	85
Beogradska	Beogradski	77	3 838
	Mačvanski	60	271
	Kolubarski	6	48
	Šumadijski	18	107
	Podunavski	4	4
	Braničevski	10	20
	Borski	3	7
	Zlatiborski	9	65
	Moravički	2	11
	Pomoravski	24	10
	Zaječarski	4	0
	Raški	13	85
	Rasinski	11	43
	Toplički	0	28
	Nišavski	2	19
	Jablanički	2	34
	Pirotski	0	8
Pčinjski	1	23	
Ukupno		680	6.625

Grupisanje uzetih uzoraka mleka po teritorijalnom kriterijumu izvršeno je analogno modelu opisanom u delu ovog poglavlja koji se odnosi na kukuruz. Vremensko grupisanje je, međutim, modifikovano, tako da su umesto dva, uzorci mleka podeljeni na tri perioda.

4.2. ELISA metoda za određivanje aflatoksina B₁ u kukuruzu

ELISA metoda za određivanje AfB₁ zasnovana je na fabričkom kitu "Celer AFLA B₁" proizvođača „Tecna S.r.l.“, Italija. Metoda se sprovodi prema uputstvu proizvođača. U kitu se nalaze premiks - mikrotitar ploče i ploče impregnirane anti - AfB₁ antitelima, pripremljeni rastvori standarda AfB₁ (0; 1; 5; 20 i 40 µg/L), rastvor enzim - konjugata, rastvor za izazivanje boje, PBS rastvor i "stop - rastvor". Metanol i voda su bili HPLC čistoće i nabavljeni su od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD), Natrijum hlorid je bio p.a. čistoće, nabavljen od proizvođača Merck (Darmstadt, Nemačka).

Prethodno samleven kukuruz je dodatno homogenizovan ručnim mešanjem i 5 g laboratorijskog uzorka je odmereno na tehničkoj vagi Ohouse (New Jersey, SAD) model "Adventurer" sa tačnošću od 0,01 g u laboratorijsku čašu od 100 mL. Dodato je 1 g NaCl i 25 mL 70 % vodenog rastvora metanola. Ekstrakcija je vršena mešanjem na orbitalnom šejkeru IKA-Werke (Staufen, Nemačka), model "OS 10 Control" na 150 obrtaja u minutu (o/min) u trajanju od 10 minuta. Ekstrakt je zatim profiltriran kroz najlonske špric filtere prečnika pora 0,22 µm u čiste staklene kivete od 15 mL.

Iz ELISA kita je pripremljena najpre premiks - mikrotitar ploča. Broj otvora na ploči je pripremljen tako da odgovara broju kalibracionih standarda, slepe probe uzorka, obogaćene slepe probe i broju analiziranih uzoraka. U svaki otvor je automatskom pipetom preneto 100 µL enzim - konjugata, a zatim je dodato 50 µL standardnih rastvora, slepe probe, obogaćene slepe probe i uzoraka. Smeša uzorka i enzim - konjugata je homogenizovana u svakom otvoru mikrotitar ploče uvlačenjem i izbacivanjem sadržaja mikropipetom 3 puta. 100 µL smeše je preneto iz svakog otvora premiks ploče u korespondentne otvore mikrotitar ploče impregnirane anti - AfB₁ antitelima. Inkubacija se odvijala na sobnoj temperaturi 10 minuta. Zatim je ploča ispirana slanim fosfatnim puferom (PBS) tri puta i dodato je u svaki otvor 100 µL rastvora za izazivanje boje (3,3' 5,5' tetrametil

benzidina – TMB). Ploča je postavljena na orbitalni šejker i uz lagano protresanje (50 o/min), inkubacija se odvijala 5 minuta. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 50 µL 0,1 M sumporne kiseline (“stop – rastvor”).

Apsorbanca (optička gustina) je merena ELISA čitačem Thermo Scientific (Waltham, MA, SAD), model 364, na 450 nm. Kalibracionu pravu i proračun koncentracija izračunava softver “Ascent”, v1.0).

Kalibracija se izvodila u 5 tačaka, a uz svaku seriju uzoraka su, pored kalibracionih standarda, analizirani kontrolni uzorci (slepa proba i slepa proba obogaćena standardom AfB₁ na nivou od 5 µg/kg). Limit detekcije metode je 1 µg/kg za kukuruz. Specifičnost je 100 % za AfB₁, 5 % za AfB₂, 19 % za AfG₁ i <1 % za AfG₂. Koeficijent varijacije replikata je manji od 3 %. Prinos metode je 91 %. Svi rezultati su korigovani na eksperimentalno utvrđeni prinos metode.

4.3. ELISA metoda za određivanje aflatoksina M₁ u mleku

ELISA metoda za određivanje AfM₁ zasnovan je na fabričkom kitu “Aflatoxin M₁ Tecna kit” proizvođača „Tecna S.r.l.”, Italija. Princip metode se zasniva na kompetitivnoj imunoenzimskoj reakciji, gde za razliku od određivanja AfB₁, pozitivan nalaz predstavlja odsustvo boje proporcionalno koncentraciji AfM₁ u uzorku. Metoda se sprovodi prema uputstvu proizvođača. U kitu se nalaze mikrotitar ploče čiji su otvori impregnirani anti – AfM₁ antitelima, pripremljeni rastvori standarda AfM₁ (0; 5; 10; 25; 50; 100 i 250 ng/L), rastvor enzim – konjugata, rastvor za izazivanje boje, PBS rastvor i “stop – rastvor”.

Uzorci mleka su dekantovani u staklene graduisane kivete za centrifugu od 15 mL. Kivete su postavljene u stalak i mleko je ohlađeno u frižideru na temperaturu od 4°C. Kivete su zatim postavljene u centrifugu Thermo Scientific (Waltham, MA, SAD) Heraeus™ model “Labofuge 200” i uzorci su centrifugirani na

3700 o/min na 2°C. Svrha hlađenja i centrifugiranja mleka je da se na površini izdvoji mlečna mast, pošto se za analizu koristi obezmašćeno mleko.

Broj otvora na mikrotitar ploči ELISA kita je pripremljen tako da odgovara broju kalibracionih standarda, slepe probe uzorka, obogaćene slepe probe i broju analiziranih uzoraka. U svaki otvor je automatskom pipetom preneto 100 µL standardnih rastvora, slepe probe, obogaćene slepe probe i uzoraka. Inkubacija se odvijala 45 minuta na sobnoj temperaturi. Mikrotitar ploča je zatim ispirana 5 puta PBS rastvorom. U svaki otvor je potom dodato 100 µL enzim – konjugata i ploča je inkubirana uz lagano protresanje na orbitalnom šejkeru IKA-Werke (Staufen, Nemačka), model “OS 10 Control” na 150 o/min, 15 minuta na sobnoj temperaturi. Ploča je zatim isprana PBS rastvorom još 5 puta i u svaki otvor je dodato 100 µL rastvora za izazivanje boje (3,3' 5,5' tetrametil benzidina – TMB). Ploča je zatim prekrivena poklopcem koji štiti od svetlosti i ponovo inkubirana na orbitalnom šejkeru 15 minuta na sobnoj temperaturi. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 50 µL 0,1 M sumporne kiseline (“stop – rastvor”). Nakon zaustavljanja reakcije, apsorbanca je očitavana u roku od 60 minuta.

Apsorbanca (optička gustina) je merena ELISA čitačem Thermo Scientific (Waltham, MA, SAD), model 364, na 450 nm. Kalibracionu pravu i proračun koncentracija izračunava pomoću softvera “Ascent”, v1.0).

Kalibracija je rađena u sedam tačaka, a uz svaku seriju uzoraka su, pored kalibracionih standarda, analizirani kontrolni uzorci (slepa proba i slepa proba obogaćena standardom AfM₁ na nivou od 0,05 µg/kg). Limit detekcije metode je 0.005 µg/kg za mleko (sirovo ili termički obrađeno). Specifičnost je 100 % za AfM₁ i 16 % za AfM₂. Koeficijent varijacije replikata je manji od 6 %. Prinos metode je 110 %. Očitavanje se vrši na automatskom čitaču „Multiscan Ascent” (Thermo Labsystems, Germany) na 450 nm. Akviziciju i obradu sirovih podataka obavlja „Ascent” softver istog proizvođača.

ELISA metode za određivanje AfB₁ u kukuruzu i AfM₁ u mleku su rutinske analitičke metode Instituta za higijenu i tehnologiju mesa u Beogradu, interno validovane i akreditovane od strane Akreditacionog tela Srbije.

4.4 UPLC-MS/MS metoda za određivanje aflatoksina B₁ u kukuruzu

Kao polazna osnova za razvijanje metode za određivanje AfB₁ u kukuruzu korišćena je modifikovana metoda (Sulyok, Krska i Schuhmacher, 2007).

Osnovni standardni rastvor AfB₁ (c=2 µg/mL u acetonitrilu) je kupljen od Sigma-Aldrich (St Louis, MO, SAD). Acetonitril, metanol i voda HPLC čistoće su nabavljeni od istog proizvođača. Sirćetna kiselina p.a. čistoće i sumporna kiselina p.a. čistoće su nabavljene od kompanije Merck (Darmstadt, Nemačka). Radni rastvor standarda AfB₁ (c=0,2 µg/mL) je dobijen razblaživanjem 0,5 mL osnovnog standarda u normalnom sudu od 5 mL acetonitriлом. Kalibracioni rastvori standarda AfB₁ pravljani su razblaživanjem radnog rastvora (c=0,2 µg/mL) u vialama autosamplera do krajnjih koncentracija od 5, 10, 15 i 20 ng/mL. Svi standardni rastvori pravljani su u kapelama sa minimalnom količinom svetlosti i u zatamnjanim normalnim sudovima. Osnovni standardni rastvor i radni rastvor čuvani su u zamrzivaču na -18°C, dok su kalibracioni rastvori pripremani neposredno pre izvođenja analize.

Deset grama samlevenog i homogenizovanog zrna kukuruza je odmereno na tehničkoj vagi Tehnica (Železniki, Slovenija), model ET-1111 sa tačnošću od 0,1 g, u laboratorijsku čašu od 100 mL i preliveno sa 40 mL smeše acetonitril-voda-sirćetna kiselina u zapreminskom odnosu 79:20:1. Nakon preliivanja, čaše su postavljene na orbitalni šejker IKA-Werke (Staufen, Nemačka), model "OS 10 Control" i ekstrakcija se odvijala na 150 o/min 1 čas na sobnoj temperaturi. Uz svaki set uzoraka su pripremani kontrolni uzorci (1 slepa proba i tri slepe probe obogaćene AfB₁ u koncentracijama od 5 µg/kg, 10 µg /kg i 20 µg/kg). Nakon

ekstrakcije i taloženja kukuruza na dno čaše, automatskom pipetom je odmereno 500 μ L supernatanta kome je dodato 500 μ L smeše acetonitril-voda-sirćetna kiselina u zapreminskom odnosu 79:20:1. Jedan mililitar dobijenog rastvora je profiltriran kroz najlonski špric-filter prečnika pora 0,2 μ m direktno u vialu za autosampler.

UPLC-MS/MS instrument se sastoji od Waters Acquity UPLC sistema (Waters, Milford, MA, SAD) sa kvaternarnom pumpom, autosamplerom, grejačem kolone i tripl kvadripol masenim spektrometrom „TQD” (Waters Micromass, Manchester, Velika Britanija) Hromatografija je izvedena na Merck (Darmstadt, Nemačka) Purospher Star RP-18, reverzno-faznoj koloni (50x2.1 mm), veličina čestica 2 μ m. Mobilna faza se sastojala od 0.1 % sirćetne kiseline u vodi i metanola u odnosu 40:60. Protok je bio izokratni i iznosio je 0,25 mL/min. Separacija na hromatografskoj koloni se odvijala na 30 \pm 1°C. Temperatura uzoraka u autosampleru je održavana na 20 \pm 1°C.

Jonizacija AfB₁ do molekuskog jona se izvodila korišćenjem elektrosprej sistema u pozitivnom modu (ES+). Temperatura jonskog izvora je bila 115°C a desolvacionog gasa 350°C. Kapilarni napon je iznosio 4000 V a napon na konusu 35 V. Kolizioni gas je Ar₂. Detekcija se izvodila u MRM načinu rada spektrometra, praćenjem molekulskih masa molekuskog jona (313.1 Da) i tri tranziciona produkta (285,2 Da, 270,1 Da i 241,1 Da). Kvantifikacioni tranzicioni produkt je bio fragment molekulske mase 285,2 Da. Akviziciju i obradu podataka obavljao je MassLynx 4.1 softver proizvođača Waters. Kalibracija se izvodila u pet tačaka uključujući i nulu. Limit detekcije metode je 0.5 μ g/kg, koeficijent varijacije replikata je 4 %. Prinos metode je 86-92 %.

4.5. UPLC-MS/MS metoda za određivanje aflatoksina M₁ u mleku.

Kao polazna osnova za razvijanje metode za određivanje AfM₁ u mleku korišćena je modifikovana metoda (Sørensen i Elbæk, 2005).

Standard AfM₁ (5 µg u supstanci) je kupljen od Sigma-Aldrich (St Louis, MO, SAD). Acetonitril, metanol, n-heksan i voda HPLC čistoće su nabavljeni od istog proizvođača. Sirćetna kiselina p.a. čistoće i sumporna kiselina p.a. čistoće su nabavljene od Merck (Darmstadt, Nemačka). Osnovni rastvor standarda AfM₁ (c=5 µg/mL) je dobijen rastvaranjem supstance u 1 mL acetonitrila. Radni rastvor standarda AfM₁ (c=0,5 µg/mL) je dobijen razblaživanjem 0,5 mL osnovnog standarda u normalnom sudu od 5 mL acetonitriлом. Kalibracioni rastvori standarda AfM₁ pravljani su razblaživanjem radnog rastvora u vialama autosamplera do krajnjih koncentracija od 0,1; 0,2; 0,5 i 1 ng/mL Svi standardni rastvori pravljani su u kapelama sa minimalnom količinom svetlosti i u zatamnjenim normalnim sudovima. Osnovni standardni rastvor i radni rastvor čuvani su u zamrzivaču na -18°C, dok su kalibracioni rastvori pripremani neposredno pre izvođenja analize.

Mleko je pre ekstrakcije AfM₁ podvrgnuto procesu obezmašćivanja. Deset mililitara mleka je preneto u polipropilenske kivete za centrifugu od 50 mL. Kivete su zatim prenete u zamrzivač 10 minuta na -18°C na da bi se mleko ohladilo na 1-4°C. Kivete su zatim centrifugirane u centrifugi Sigma (Osterode am Harz, Nemačka), model 2-16P na 3000 o/min 5 minuta. Na ovaj način se mlečna mast izdvaja iz mleka i formira površinski sloj. Automatskom pipetom je uzeto 5 ml obezmašćenog mleka sa dna kivete i preneto u čistu polipropilensku kivetu za centrifugu od 50 mL. Mleku je dodato 100 µL 18 % vodenog rastvora sumporne kiseline. Kivete su blago protresane i ostavljene u mraku 10 minuta. Indikator papirom je proverena pH vrednost zakišeljelog uzorka. Prihvatljiva pH vrednost je bila $2 \pm 0,5$.

Zatim je dodato 16 mL acetonitrila i 10 mL n-heksana. Dobijena smeša je homogenizovana na vibracionoj mešalici – vorteksu proizvođača Bibby Scientific Ltd (Staffordshire, Velika Britanija), model SA-8 u trajanju od 30 sekundi. AfM₁ je zatim ekstrahovan na orbitalnom šejkeru IKA-Werke (Staufen, Nemačka), model “OS 10 Control” 10 minuta na 150 o/min, nakon čega su kivete postavljene u centrifugu i uzorci centrifugirani 15 min na 4000 o/min. Staklenom pipetom je odvojen i odbačen gornji sloj n-heksana. Acetonitrilni sloj je dekantovan u staklene balone za uparavanje. Acetonitril je uparen u vakuum uparivaču Heidolph (Schwabach, Nemačka), model „LabRota 4011 – Digital” na 60°C do suva. Suvi ostatak je rekonstituisan u 2 mL acetonitrila i prenet nakon filtriranja kroz najlonski špric filter veličine pora 0,22 μm direktno u vialu za autosampler.

UPLC-MS/MS instrument se sastoji od Waters Acquity UPLC sistema (Waters, Milford, MA, USA) sa kvaternarnom pumpom, autosamplerom, grejačem kolone i tripl kvadripol masenim spektrometrom „TQD” (Waters Micromass, Manchester, Velika Britanija) Hromatografija je izvedena na Merck (Darmstadt, Nemačka) Purospher Star RP-18, reverzno-faznoj koloni (50x2.1 mm), veličina čestica 2 μm. Mobilna faza se sastojala od 0.1% sirćetne kiseline u vodi i metanola u odnosu 35:65. Protok je izokratni i iznosio je 0,30 mL/min. Separacija na hromatografskoj koloni se odvijala na 35 ± 1°C. Temperatura uzoraka u autosampleru je održavana na 20 ± 1°C.

Jonizacija AfM₁ do molekuskog jona se izvodi korišćenjem elektrosprej sistema u pozitivnom modu (ES+). Temperatura jonskog izvora je bila 120°C a desolvacionog gasa 350°C. Kapilarni napon je iznosio 4000 V a napon na konusu 35 V. Kolizioni gas je bio Ar₂. Detekcija se izvodila u MRM načinu rada spektrometra, praćenjem molekulskih masa molekuskog jona (329 Da) i dva tranziciona produkta (273 Da i 259.1 Da). Kvantifikacioni tranzicioni produkt je bio fragment molekulske mase 259,1 Da. Akviziciju i obradu podataka je obavljao MassLynx 4.1 softver istog proizvođača kao i instrument. Kalibracija se izvodila u

pet tačaka uključujući i nulu. Limit detekcije metode je 0,02 µg/kg, koeficijent varijacije replikata je 5,2 %. Prinos metode je 65-81 %.

4.6. Validacija UPLC-MS/MS metoda za određivanje aflatoksina B₁ u kukuruzu i aflatoksina M₁ u mleku

Validacija UPLC-MS/MS metoda za određivanje AfB₁ u kukuruzu i AfM₁ u mleku izvedena je korišćenjem protokola EU referentne laboratorije RIKILT (Wageningen, Holandija). Određivanje validacionih parametara iz rezultata validacije je obavljeno korišćenjem softvera „ResVal v. 2.3” koji je izradila ista laboratorija. Validacija metode za AfB₁ u kukuruzu je izvršena na nivou od 20 µg/kg, dok je validacija metode za određivanje AfM₁ u mleku izvršena na nivou od 0,05 µg/kg, što su ujedno i MDK vrednosti koje su na snazi u EU.

Validacioni proces se sastojao od 4 eksperimenta za AfB₁ i 4 eksperimenta za AfM₁. Svaki eksperiment je izveden za jedan dan. Odabrani su reprezentativni uzorci kukuruza i mleka za koje je analizom ustanovljeno da ne sadrže AfB₁ i AfM₁. Ukupno je odabrano 73 uzorka kukuruza i 73 uzorka mleka. Uzorci kukuruza su obogaćivani dodavanjem standardnih rastvora AfB₁ prema šemi prikazanoj u tabeli 9.

Tabela 9. Šema obogaćenja uzoraka kukuruza standardnim rastvorima AfB₁ u procesu validacije

	Eksperiment 1 Obogaćenje (µg/kg AfB₁)	Eksperiment 2 Obogaćenje (µg/kg AfB₁)	Eksperiment 3 Obogaćenje (µg/kg AfB₁)
1 uzorak	0	0	0
6 uzoraka	2,5	2,5	2,5
6 uzoraka	5	5	5
6 uzoraka	7,5	7,5	7,5
1 uzorak	10	10	10
1 uzorak	25	25	25

Eksperiment 4 se sastojao od odabira 10 različitih uzoraka kukuruza koji ne sadrže AfB₁ i njihovom analiziranjem, a zatim obogaćenjem tih istih uzoraka standardnim rastvorom AfB₁ do koncentracije od 20 µg/kg i analiziranjem na ovaj način obogaćenih uzoraka.

Uzorci mleka su obogaćivani dodavanjem standardnih rastvora AfM₁ prema šemi prikazanoj u tabeli 10.

Tabela 10. Šema obogaćenja uzoraka mleka standardnim rastvorima AfM₁ u procesu validacije

	Eksperiment 1 Obogaćenje (µg/kg AfM₁)	Eksperiment 2 Obogaćenje (µg/kg AfM₁)	Eksperiment 3 Obogaćenje (µg/kg AfM₁)
1 uzorak	0	0	0
6 uzoraka	0,025	0,025	0,025
6 uzoraka	0,05	0,05	0,05
6 uzoraka	0,075	0,075	0,075
1 uzorak	0,1	0,1	0,1
1 uzorak	0,25	0,25	0,25

Eksperiment 4 se sastojao od odabira 10 različitih uzoraka mleka koji ne sadrže AfM₁ i njihovom analiziranjem, a zatim obogaćenjem tih istih uzoraka standardnim rastvorom AfM₁ do koncentracije od 0,05 ug/kg i analiziranjem na ovaj način obogaćenih uzoraka.

Svi uzorci kukuruza i mleka su pripremani i analizirani prema prethodno prikazanim UPLC-MS/MS metodama. Rezultati su uneti u ResVal softver i izračunati su parametri validacije.

Sva ispitivanja (ELISA i UPLC-MS/MS metode), kao i postupak validacije su izvedeni u laboratorijama Instituta za higijenu i tehnologiju mesa u Beogradu.

4.7. Statistička obrada rezultata

Dobijeni rezultati su grupisani u statističke celine kako je ranije opisano u ovom poglavlju. Statistička obrada rezultata ispitivanja zastupljenosti AfB₁ u kukuruza i AfM₁ u mleku obrađeni su primenom JMP 10 i Microsoft Excell 2007 softvera. Prilikom obrade primenjene su sledeće metode: deskriptivni statistički

parametri, ANOVA test i regresiona analiza. ANOVA test je rađen na intervalu pouzdanosti od 5%. Dobijeni i obrađeni rezultati prikazani su u vidu tabela, grafikona i slika.

5. REZULTATI

U ovom poglavlju prikazani su rezultati ispitivanja sadržaja AfB₁ u kukuruzu i AfM₁ u mleku na područjima i u vremenskom periodu definisanim u poglavlju koje se odnosi na materijal i metode rada. Takođe su prikazani rezultati validacije UPLC-MS/MS metoda za određivanje AfB₁ i AfM₁ u kukuruzu i mleku, kao i poređenje ELISA i UPLC-MS/MS tehnika za određivanje AfB₁ i AfM₁.

Radi bolje preglednosti, ovo poglavlje je podeljeno na tri glavne celine i to:

1. Rezultati koji se odnose na prisustvo i sadržaj AfB₁ u kukuruzu. Ova celina se sastoji od pregleda broja analiziranih uzoraka kukuruza prema definisanim regijama i periodima ispitivanja, kao i analize sadržaja i distribucije AfB₁ u kukuruzu po regijama i periodima;
2. Rezultati koji se odnose na prisustvo i sadržaj AfM₁ u mleku. Ova celina se sastoji od pregleda broja analiziranih uzoraka mleka prema definisanim regijama i periodima ispitivanja, kao i analize sadržaja i distribucije AfM₁ u mleku po regijama i periodima;
3. Rezultati koji se odnose na validaciju UPLC-MS/MS metoda za određivanje sadržaja AfB₁ u kukuruzu i AfM₁ u mleku, kao i poređenje ELISA i UPLC-MS/MS metoda.

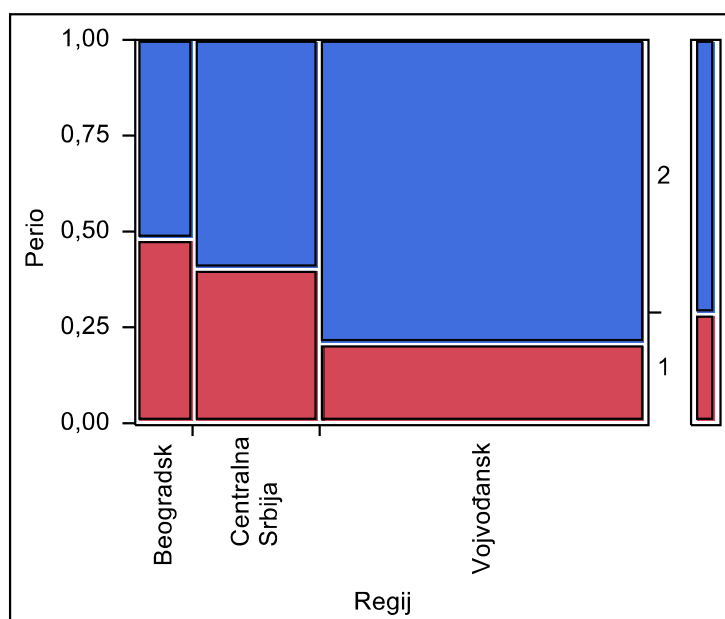
Rezultati su prikazani u vidu tabela, grafikona i slika za odgovarajuće ispitivane parametre.

5.1 Aflatoksin B₁ u kukuruзу

5.1.1 Pregled broja analiziranih uzoraka po regijama i periodima

Ovaj deo poglavlja koji se odnosi na rezultate je posvećen analizi broja uzoraka kukuruза uzetih za analizu na prisustvo AfB₁. Imajući u vidu da je uzorkovanje kukuruза izvršeno u tri regije Republike Srbije tokom dva perioda uzorkovanja, rezultati vezani za broj uzetih uzoraka i njihovu distribuciju u prostornom i vremenskom domenu grupisani su koristeći mozaični dijagram. Ovaj grafik omogućava prikaz odnosa između više varijabli (regije i perioda) statističke serije podataka.

Grafikon 6 predstavlja mozaični dijagram i prikazuje odnos uzetih uzoraka kukuruза u beogradskoj regiji, centralnoj Srbiji i vojvođanskoj regiji tokom prvog i drugog perioda uzorkovanja.



Grafikon 6. Mozaični dijagram broja uzoraka kukuruза uzetih na ispitivanje sadržaja AfB₁

Na x-osi grafikona prikazane su regije, a podela x-ose je proporcionalna broju uzetih uzoraka. Tako se vidi da je najviše uzoraka kukuruza uzeto iz vojvođanske regije dok je najmanje uzeto iz beogradske. Sa desne strane y-ose prikazani su periodi, a podela y-ose je proporcionalna broju uzetih uzoraka kukuruza po periodima.

Konkretne vrednosti broja uzoraka kukuruza i njihovih procentualnih odnosa date su u tabeli 11 koja predstavlja multivarijantnu tabelu raspodele frekvencija. U tabeli je prikazan broj uzetih uzoraka kukuruza na ispitivanje sadržaja AfB₁ u tri regije i tokom dva perioda, kao i njihova procentualna zastupljenost u okviru svake regije i/ili perioda.

Tabela 11. Broj uzoraka kukuruza uzetih na ispitivanje sadržaja AfB₁ po regijama i periodima ispitivanja

	1. period	2. period	Ukupno periodi
Beogradska regija – broj uzoraka	37	40	77
% u odnosu na ukupan br. uzoraka	5,44	5,88	11,32
% u odnosu na br. uzoraka po periodu	18,88	8,26	
% u odnosu na br. uzoraka po regiji	48,05	51,95	
Centralna Srbija – broj uzoraka	68	101	169
% u odnosu na ukupan br uzoraka	10,00	14,85	24,85
% u odnosu na br uzoraka po periodu	34,69	20,87	
% u odnosu na br uzoraka po regiji	40,24	59,76	
Vojvođanska regija – broj uzoraka	91	343	434
% u odnosu na ukupan br uzoraka	13,38	50,44	63,82
% u odnosu na br uzoraka po periodu	46,43	70,87	
% u odnosu na br uzoraka po regiji	20,97	79,03	
Ukupno – broj uzoraka	196	484	680
% u odnosu na ukupan broj uzoraka	28,82	71,18	

Ovakav tip tabele predstavlja najbolji način prikazivanja serija podataka koji su razvrstani po više kriterijuma. Radi lakšeg razumevanja vrednosti koje su u

tabeli prikazane objasnićemo način čitanja tabele na primeru: ukupno je uzeto 680 uzoraka kukuruza, od toga 196 uzoraka (28,82%) u prvom i 484 uzorka (71,18%) u drugom periodu. U beogradskoj regiji uzeto je 77 uzoraka (11,32%) od ukupnog broja uzoraka, od toga, u prvom periodu 37 uzoraka ili 5,44% od ukupnog broja uzoraka, odnosno 18,88% od broja uzoraka uzetih u 1. periodu u svim regijama ili 48,05% uzoraka uzetih u beogradskoj regiji u oba perioda. Isto tumačenje se primenjuje i na ostale dve regije (centralna Srbija i vojvođanska regija).

5.1.2 Sadržaj aflatoksina B₁ u regijama

Pre iznošenja rezultata vezanih za sadržaj AfB₁ u kukuruzu treba naglasiti da će deo rezultata koji se odnose na MDK vrednost biti prikazani dvojakom: u obzir će najpre biti uzeta trenutno važeća nacionalna regulativa koja ograničava sadržaj AfB₁ u kukuruzu na 50 µg/kg u hranivima, a potom će se predstaviti rezultati i na osnovu MDK vrednosti koja je propisana u EU od 20 µg/kg. Sadržaj AfB₁ u kukuruzu po regijama u odnosu na MDK vrednost od 50 µg/kg je prikazan u tabeli 12.

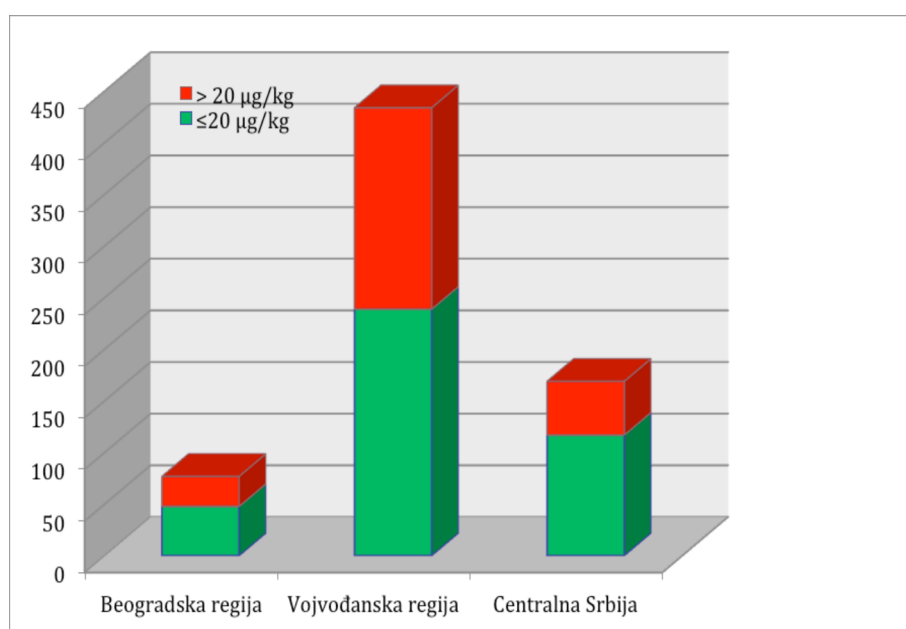
Tabela 12. Brojčana i procentualna zastupljenost uzoraka kukuruza koji sadrže AfB₁ u odnosu na MDK vrednost koja se primenjuje u Republici Srbiji

	Broj uzoraka (%) - beogradska regija	Broj uzoraka (%) - centralna Srbija	Broj uzoraka (%) - vojvođanska regija
≤ 50 µg/kg	61 (79,22%)	131 (77,51%)	305 (70,27%)
> 50 µg/kg	16 (20,77%)	38 (22,49%)	129 (29,73%)
Ukupno	77	169	434

Sadržaj AfB₁ u kukuruзу po regijama u odnosu na MDK vrednost od 20 µg/kg je prikazan u tabeli 13.

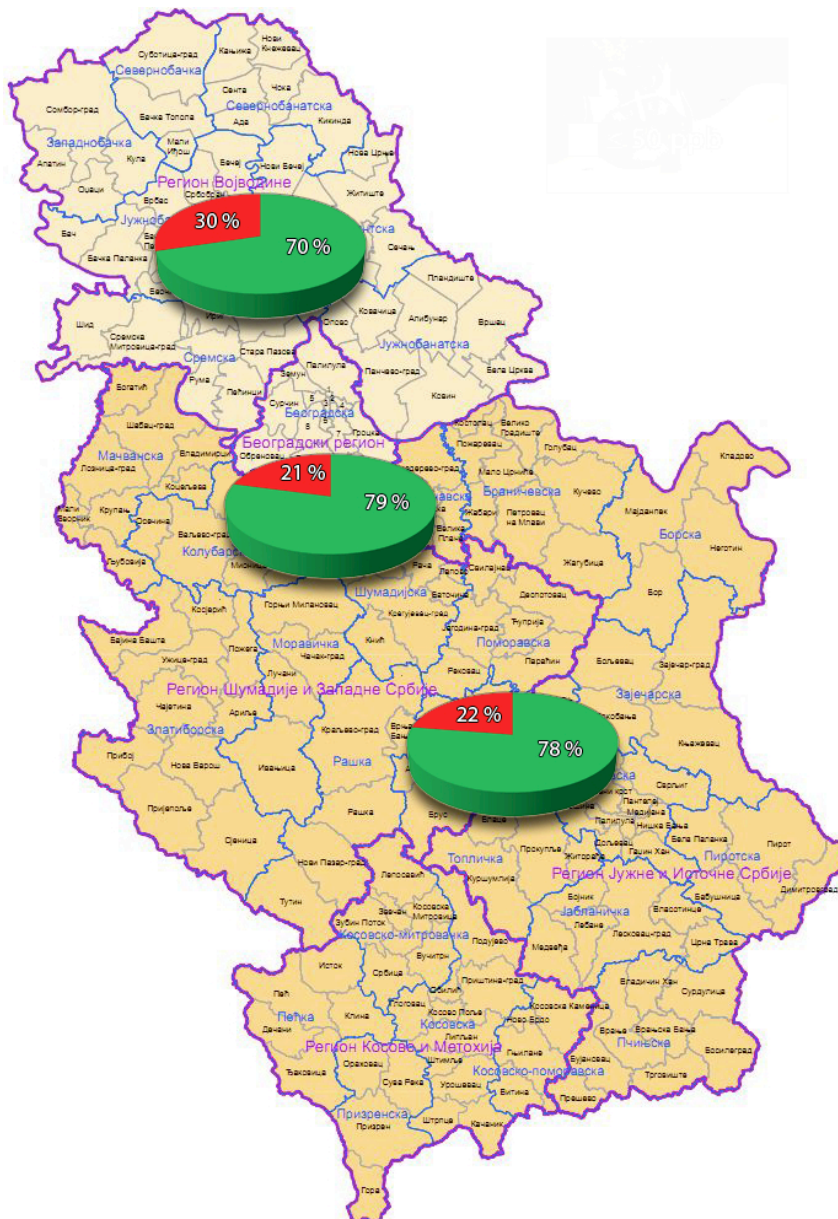
Tabela 13. Brojčana i procentualna zastupljenost uzoraka kukuruza koji sadrže AfB₁ u odnosu na MDK vrednost koja se koristi u EU

	Broj uzoraka (%) - beogradska regija	Broj uzoraka (%) - centralna Srbija	Broj uzoraka (%) - vojvođanska regija
≤ 20 µg/kg	48 (62,33%)	117 (69,24%)	239 (55,07%)
> 20 µg/kg	29 (37,66%)	52 (30,76%)	195 (44,93%)
Ukupno	77	169	434



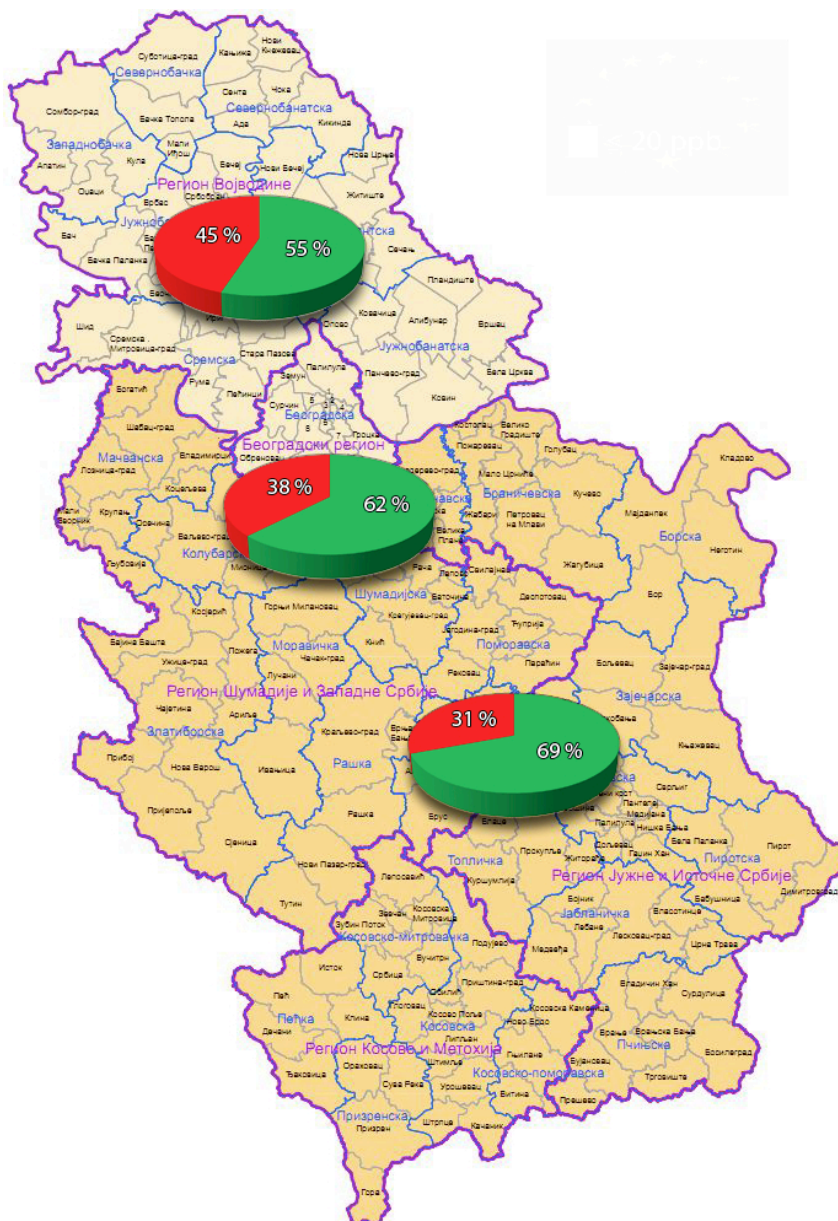
Grafikon 7. Bar dijagram broja uzoraka kukuruza ispitanih na AfB₁ po regijama u odnosu na sadržaj AfB₁ prema MDK vrednosti koje se primenjuju u EU (crvena boja prikazuje prekoračenje MDK vrednosti preko 20 µg/kg, zelena boja prikazuje uzorke sa sadržajem AfB₁ ispod ove vrednosti).

Slika 14 prikazuje kartu Republike Srbije sa strukturnim krugovima za svaku regiju i procenat ispitanih uzoraka kukuruza na AfB₁ koji prekoračuju (crvena boja) ili zadovoljavaju (zelena boja) MDK vrednost od 50 µg/kg koja se primenjuje u Republici Srbiji.



Slika 14. Objedinjeni prikaz sadržaja AfB₁ u kukuruzu u Republici Srbiji u odnosu na MDK vrednost koja se primenjuje u Republici Srbiji (crvena boja – preko MDK; zelena boja – ispod MDK)

Slika 15 prikazuje kartu Republike Srbije sa strukturnim krugovima za svaku regiju i procenat ispitanih uzoraka kukuruza na AfB₁ koji prekoračuju (crvena boja) ili zadovoljavaju (zeleno boja) MDK vrednost od 20 µg/kg koja se primenjuje u EU.



Slika 15. Objedinjeni prikaz sadržaja AfB₁ u kukuruzu u Republici Srbiji u odnosu na MDK vrednost koja se primenjuje u EU (crvena boja – preko MDK; zelena boja – ispod MDK)

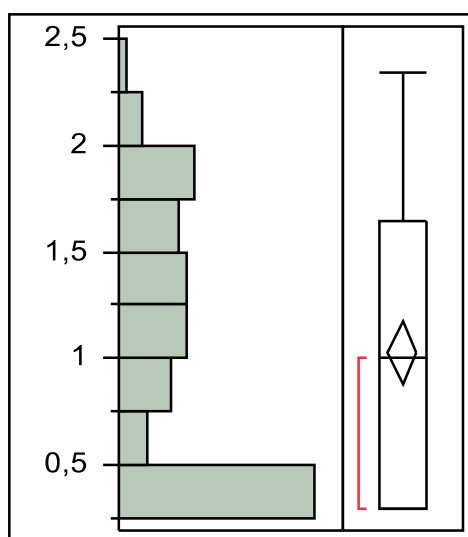
5.1.3 Distribucija aflatoksina B₁ kroz regije

U ovom poglavlju prikazana je distribucija AfB₁ u uzorcima kukuruza po regijama. Pre prikazivanja rezultata potrebno je osvrnuti se na nekoliko detalja vezanih za način njihovog prikazivanja. U situacijama kada se vrši merenje velikog broja uzoraka sa širokim rasponom vrednosti (od odsustva AfB₁ u uzorku do čak 560 µg/kg AfB₁ zabeleženih u jednom uzorku iz centralne Srbije), distribucija ovakve statističke serije je eksponencijalna. Najveći broj rezultata grupisan je oko najniže vrednosti, i što su vrednosti veće, broj uzoraka opada. Ovo znači da je prisutno znatno rasipanje podataka i to u prvom redu zahvaljujući velikom rasponu između rezultata. Da bi se prevazišla ovakva situacija u statističkoj obradi rezultata, pribegava se njihovoj matematičkoj transformaciji logaritmovanjem svake pojedinačne vrednosti dekadnim logaritmom (\log_{10}). Na ovaj način se vrednosti centralizuju uz očuvanje njihovog međusobnog odnosa, što omogućava utvrđivanje statističke značajnosti razlika među pojedinim statističkim serijama korišćenjem parametrijskih testova (ANOVA).

Konkretno govoreći, logaritmovanjem serije od 680 uzoraka kukuruza koje su se karakterisale vrednostima od <2 µg/kg (limit detekcije ELISA metode) do 560 µg/kg, dobijaju se vrednosti od 0,3 do 2,75.

Rezultati vezani za distribuciju AfB₁ u odnosu na regije su prikazani na ovaj način. Zato se u histogramima koji prikazuju distribuciju, kao i u analizi statističke značajnosti razlika nalaze logaritamske vrednosti rezultata. Međutim, u tekstualnom i tabelarnom prikazivanju statističkih parametara korišćene su apsolutne vrednosti za sadržaj AfB₁ izražene u µg/kg.

Grafikon 8 predstavlja histogram koji prikazuje distribuciju logaritamskih vrednosti koncentracija AfB₁ u uzorcima kukuruza uzetih na području beogradske regije. Desna strana grafikona predstavlja grafički prikaz parametara distribucije statističke serije podataka (minimalna i maksimalna vrednost, medijana standardna devijacija).

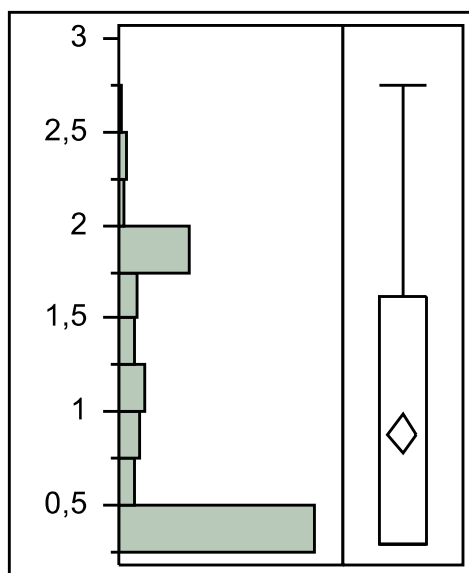


Grafikon 8. Distribucija vrednosti koncentracija AfB₁ u uzorcima kukuruza uzetih na području beogradske regije

Tabela 14. Prikaz statističkih parametara serije rezultata za AfB₁ u uzorcima kukuruza uzetih sa područja beogradske regije

Broj uzoraka	77
Maksimalna vrednost (µg/kg AfB ₁)	215
Minimalna vrednost (µg/kg AfB ₁)	<2
Srednja vrednost (µg/kg AfB ₁)	28,06
Medijana (µg/kg AfB ₁)	10
Srednja vrednost u gornjem intervalu od 95% (µg/kg AfB ₁)	37,1
Srednja vrednost u donjem intervalu od 95% (µg/kg AfB ₁)	19,02

Grafikon 9 predstavlja histogram koji prikazuje distribuciju logaritamskih vrednosti koncentracija AfB₁ u uzorcima kukuruza uzetih na području centralne Srbije

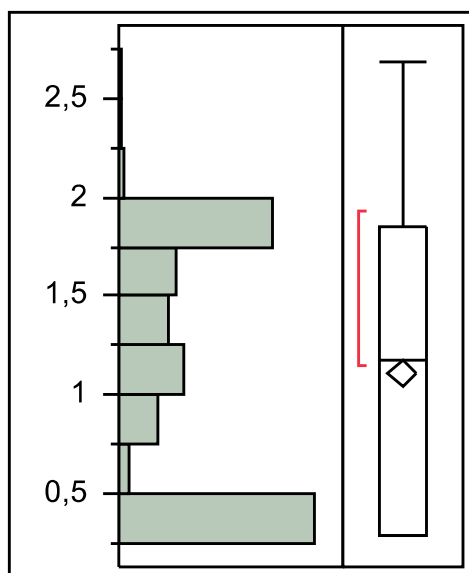


Grafikon 9. Distribucija vrednosti koncentracija AfB₁ u uzorcima kukuruza uzetih na području centralne Srbije

Tabela 15. Prikaz statističkih parametara serije rezultata za AfB₁ u uzorcima kukuruza uzetih sa područja centralne Srbije.

Broj uzoraka	169
Maksimalna vrednost (μg/kg AfB ₁)	560
Minimalna vrednost (μg/kg AfB ₁)	<2
Srednja vrednost (μg/kg AfB ₁)	29,1
Medijana (μg/kg AfB ₁)	2
Srednja vrednost u gornjem intervalu od 95% (μg/kg AfB ₁)	38,17
Srednja vrednost u donjem intervalu od 95% (μg/kg AfB ₁)	20,03

Grafikon 10 predstavlja histogram koji prikazuje distribuciju logaritamskih vrednosti koncentracija AfB₁ u uzorcima kukuruza uzetih na području vojvođanske regije.



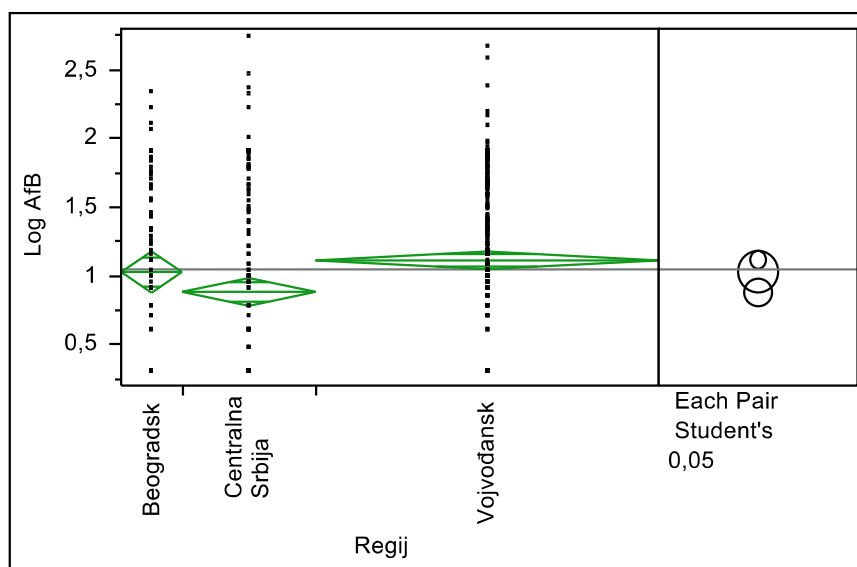
Grafikon 10. Distribucija vrednosti koncentracija AfB₁ u uzorcima kukuruza uzetih na području vojvođanske regije

Tabela 16. Prikaz statističkih parametara serije rezultata za AfB₁ u uzorcima kukuruza uzetih sa područja centralne Srbije.

Broj uzoraka	434
Maksimalna vrednost (μg/kg AfB ₁)	475
Minimalna vrednost (μg/kg AfB ₁)	<2
Srednja vrednost (μg/kg AfB ₁)	33,21
Medijana (μg/kg AfB ₁)	15
Srednja vrednost u gornjem intervalu od 95% (μg/kg AfB ₁)	37,33
Srednja vrednost u donjem intervalu od 95% (μg/kg AfB ₁)	29,10

5.1.4 Značajnost razlika u sadržaju aflatoksina B₁

Grafikon 11 prikazuje rezultate analize varijanse, odnosno statističke značajnosti razlika u sadržaju AfB₁ u uzorcima kukuruza uzetih u tri regije (beogradska regija, centralna Srbija, vojvođanska regija). Imajući u vidu da se radi o statističkoj seriji diskretnih numeričkih vrednosti (koncentracija AfB₁ izražena u µg/kg), korišćena je jednofaktorska parametarska ANOVA. Poređenje značajnosti razlika između regija izvršeno je pomoću Studentovog t-testa.



Grafikon 11. Analiza varijanse za statističku seriju logaritmovanih vrednosti koncentracija AfB₁ u kukuruзу u tri regije

Grafikon 11 je podeljen na tri celine kojima odgovaraju tri regije u kojima je obavljano ispitivanje. Horizontalna linija koja deli ceo grafikon predstavlja srednju vrednost svih podataka. Svaka regija je predstavljena romбом zelene boje. Širina romba je proporcionalna broju uzoraka ispitanih na području jedne regije. Visina romba reprezentuje interval pouzdanosti koji iznosi 95%. Linija koja deli romb po horizontalnoj osi predstavlja srednju vrednost sadržaja AfB₁ po regiji. Gornja tačka

svakog romba odgovara maksimalnoj vrednosti sadržaja AfB₁ u datoj regiji, dok donja tačka odgovara minimalnoj vrednosti.

Krugovi sa desne strane grafikona predstavljaju grafički prikaz značajnosti razlika između rezultata analize AfB₁ u tri regije. Svaki krug odgovara jednoj regiji. Veličina prečnika kruga je proporcionalna broju analiziranih uzoraka u svakoj regiji. Statistička značajnost razlika je grafički prikazana preklapanjem ili razdvojenosti krugova. Što su krugovi razdvojeniji međusobno, razlike su statistički značajnije. Ukoliko se krugovi u potpunosti preklapaju, statističke značajnosti nema.

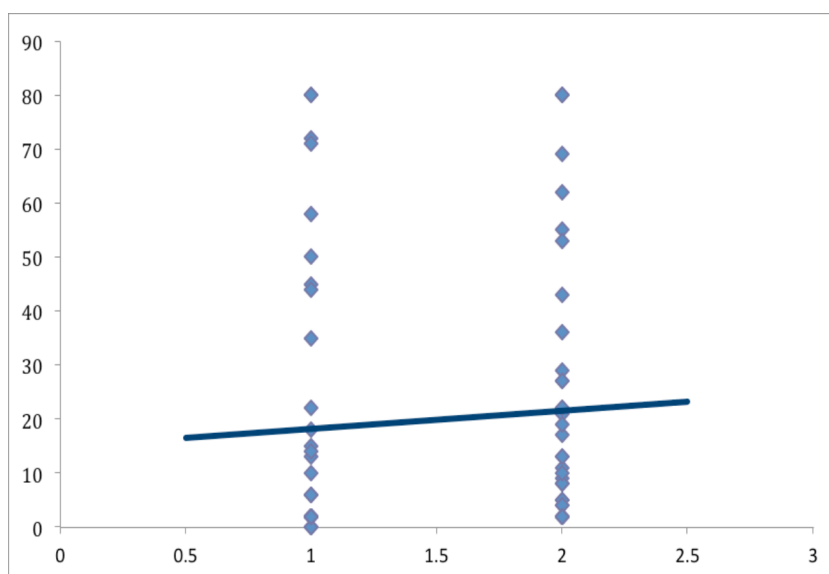
Sa grafikona 11 se može jasno videti da postoje razlike između sadržaja AfB₁ u uzorcima kukuruza uzetih iz tri regije u Republici Srbiji. Deo ovih razlika uslovljen je i brojem uzoraka koji nije jednak u pojedinim regijama. U vojvođanskoj regiji je uzeto najviše uzoraka, te je i disperzija rezultata (ilustrovana visinom romba) manja.

Studentov t-test je pokazao da najznačajnije razlike postoje u sadržaju AfB₁ u kukuruzu između regija centralne Srbije i Vojvodine ($p=0,0002$), a da statistički značajnih razlika nema u sadržaju AfB₁ u kukuruzu između beogradske regije i centralne Srbije ($p=0,1173$), kao i između vojvođanske i beogradske regije ($p=0,3034$). Ovi rezultati se slažu sa procentualnom zastupljenošću uzoraka sa prekoračenom MDK vrednošću prikazanim u prethodnom poglavlju. Na osnovu iznetih podataka može se zaključiti da je prosečan sadržaj AfB₁ u Republici Srbiji bio najveći u uzorcima kukuruza uzetih sa područja vojvođanske regije, nešto manji u kukuruzu uzetom sa područja beogradske regije a najmanji u uzorcima kukuruza uzetih sa područja centralne Srbije. Međutim, osim u slučaju vojvođanske regije i centralne Srbije, ostale razlike u sadržaju AfB₁ u kukuruzu nisu statistički značajne. Objašnjenje ovakvih rezultata leži u činjenici da je ekstremna suša koja je Republiku Srbiju pogodila u leto 2012. godine bila podjednako zastupljena u svim delovima zemlje što se jasno vidi iz izveštaja nacionalnog centra za klimatske promene prikazanom u pregledu literature ove

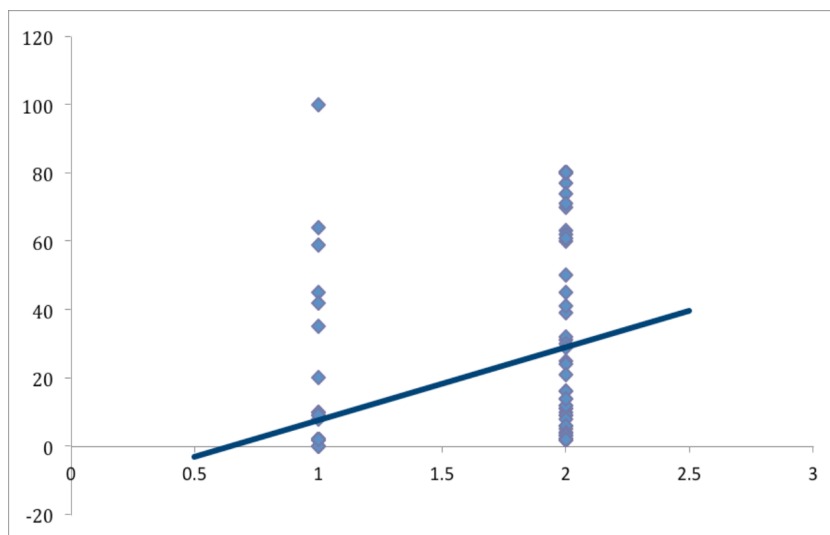
disertacije. Statistički značajna razlika između sadržaja AfB₁ u kukuruza sa područja centralne Srbije u odnosu na vojvođansku regiju može se objasniti daleko manjom proizvodnjom kukuruza u centralnoj Srbiji u odnosu na AP Vojvodinu, manjim skladišnim kapacitetima u centralnoj Srbiji u odnosu na vojvođansku regiju te manjom reprezentativnošću uzoraka uzetih iz centralne Srbije o čemu govori i broj uzetih uzoraka (434 uzorka iz vojvođanske regije u odnosu na 169 uzoraka iz centralne Srbije).

5.1.5 Promena sadržaja aflatoksina B₁ tokom vremena

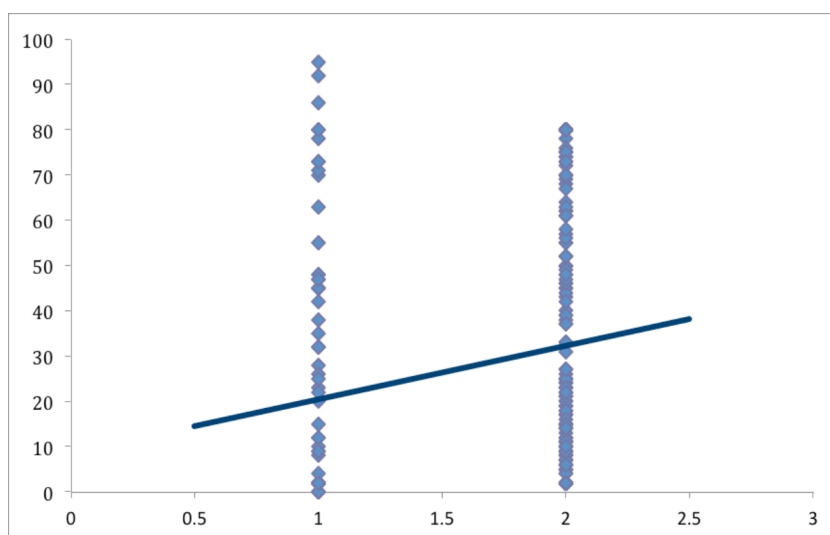
Analiza trenda kretanja sadržaja AfB₁ u uzorcima kukuruza uzetih tokom dva perioda u tri regije u Republici Srbiji izvedena je korišćenjem metode najmanjih kvadrata linearne regresije i linearnom ekstrapolacijom. Promena koncentracije AfB₁ tokom vremena je u literaturi dobro opisana pojava i direktna je posledica sekundarne kontaminacije kukuruza tokom skladištenja u neadekvatnim uslovima. Grafikoni 12, 13, 14 i 15 prikazuju trend promene koncentracije AfB₁ tokom 2 perioda uzorkovanja u beogradskoj regiji, centralnoj Srbiji, vojvođanskoj regiji i na nivou cele Republike Srbije.



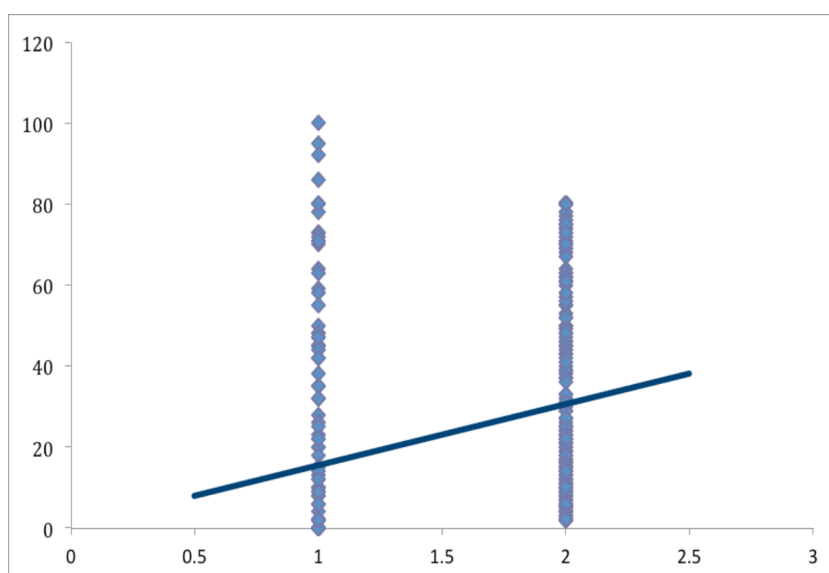
Grafikon 12. Trend promene sadržaja AfB₁ u kukuruzu uzorkovanom sa područja beogradske regije (x-osa predstavlja periode; y-osa predstavlja sadržaj AfB₁ u kukuruzu izražen u µg/kg). Jednačina linije trenda je $y=3,3068*x+14,936$



Grafikon 13. Trend promene sadržaja AfB₁ u kukuruzu uzorkovanom sa područja centralne Srbije (x-osa predstavlja periode; y-osa predstavlja sadržaj AfB₁ u kukuruzu izražen u µg/kg). Jednačina linije trenda je $y=21,378*x-13,716$



Grafikon 14. Trend promene sadržaja AfB₁ u kukuruzu uzorkovanom sa područja vojvodanske regije (x-osa predstavlja periode; y-osa predstavlja sadržaj AfB₁ u kukuruzu izražen u µg/kg). Jednačina linije trenda je $y=11,827*x+8,5358$



Grafikon 15. Trend promene sadržaja AfB₁ u kukuruzu uzorkovanom sa područja cele Republike Srbije (x-osa predstavlja periode; y-osa predstavlja sadržaj AfB₁ u kukuruzu izražen u µg/kg). Jednačina linije trenda je $y=15,097*x+0,4594$

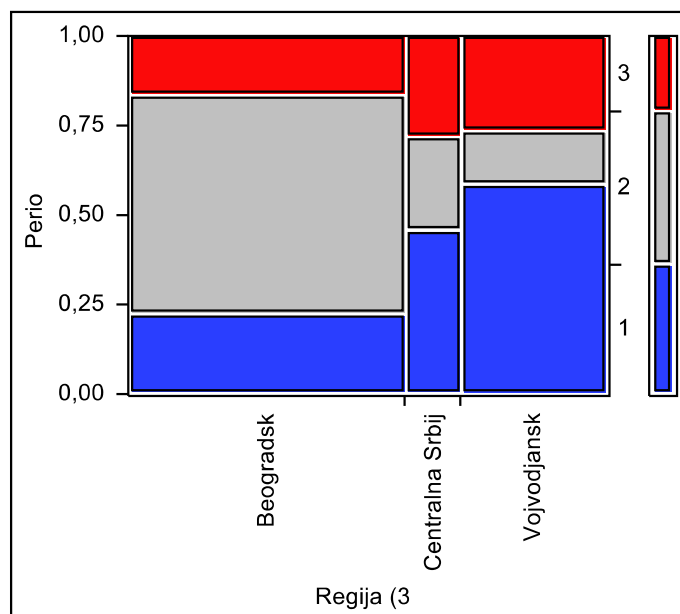
Sa grafikona se jasno može videti da linija trenda izvedena na osnovu dva perioda uzorkovanja ukazuje na rast sadržaja AfB₁ u kukuruzu kako u pojedinim regijama, tako i na nivou cele zemlje. Treba naglasiti i činjenicu da su polazna i završna tačka za konstrukciju linije trenda izvedene metodom najmanjih kvadrata statističkih serija rezultata iz prvog i drugog perioda uzorkovanja te ne predstavljaju realan nivo kontaminacije kukuruza sa AfB₁ koji je prikazan u delu poglavlja koji se odnosi na analizu distribucije sadržaja AfB₁.

5.2 Aflatoksin M₁ u mleku

5.2.1 Pregled broja analiziranih uzoraka po regijama i periodima

U ovom delu poglavlja, biće reči o analizi broja uzoraka mleka uzetih za analizu na prisustvo AfM₁. Imajući u vidu da je uzorkovanje mleka izvršeno u tri regije Republike Srbije, i za razliku od kukuruza tokom tri, umesto dva perioda uzorkovanja, rezultati vezani za broj uzetih uzoraka i njihovu distribuciju u prostornom i vremenskom domenu grupisani su koristeći mozaični dijagram. Ovaj grafik omogućava prikaz odnosa između više varijabli (regije i perioda) statističke serije podataka.

Grafikon 16 predstavlja mozaični dijagram i prikazuje odnos uzetih uzoraka mleka u beogradskoj regiji, centralnoj Srbiji i vojvođanskoj regiji tokom prvog, drugog i trećeg perioda uzorkovanja.



Grafikon 16. Mozaični dijagram broja uzoraka mleka uzetih na ispitivanje sadržaja AfM₁

Na x-osi grafikona prikazane su regije, a podela x-ose je proporcionalna broju uzetih uzoraka. Tako se vidi da je najviše uzoraka mleka uzeto iz beogradske regije dok je najmanje uzeto iz centralne Srbije. Sa desne strane y-ose prikazani su periodi, a podela y-ose je proporcionalna broju uzetih uzoraka mleka po periodima. Konkretno vrednosti broja uzoraka mleka i njihovih procentualnih odnosa date su u tabeli 17 koja predstavlja multivarijantnu tabelu raspodele frekvencija. U tabeli je prikazan broj uzetih uzoraka mleka na ispitivanje sadržaja AfM₁ u tri regije i tokom tri perioda, kao i njihova procentualna zastupljenost u okviru svake regije i/ili perioda.

Tabela 17. Broj uzoraka mleka uzetih na ispitivanje sadržaja AfM₁ po regijama i periodima ispitivanja

	1. period	2. period	3. period	Ukupno periodi
Beogradska regija – broj uzoraka	870	2.332	636	3.838
% u odnosu na ukupan br. uzoraka	13,13	35,20	9,60	57,93
% u odnosu na br. uzoraka po periodu	36,19	82,34	45,79	
% u odnosu na br. uzoraka po regiji	22,67	60,76	16,57	
Centralna Srbija – broj uzoraka	361	201	222	784
% u odnosu na ukupan br uzoraka	5,45	3,03	3,35	11,83
% u odnosu na br uzoraka po periodu	15,02	7,10	15,98	
% u odnosu na br uzoraka po regiji	46,05	25,64	28,32	
Vojvodanska regija – broj uzoraka	1.173	299	531	2.003
% u odnosu na ukupan br uzoraka	17,11	4,51	8,02	30,23
% u odnosu na br uzoraka po periodu	48,79	10,56	38,23	
% u odnosu na br uzoraka po regiji	58,56	14,93	26,51	
Ukupno – broj uzoraka	2.404	2.832	1.389	6.625
% u odnosu na ukupan broj uzoraka	36,29	42,75	20,97	

Radi lakšeg praćenja vrednosti koje su u tabeli prikazane, kao i u slučaju kukuruza na kratkom primeru ćemo pojasniti način čitanja tabele: ukupno je uzeto

6.625 uzoraka mleka, od toga 2.404 uzorka (36,29%) u prvom, 2.832 uzorka (42,75%) u drugom i 1.389 uzoraka (20,97%) u trećem periodu. U beogradskoj regiji uzeto je 3.838 uzoraka (57,93%) od ukupnog broja uzoraka, od toga, u prvom periodu 870 uzoraka ili 13,13% od ukupnog broja uzoraka, odnosno 36,19% od broja uzoraka uzetih u 1. periodu u svim regijama ili 22,67% uzoraka uzetih u beogradskoj regiji u sva tri perioda. Isto tumačenje se primenjuje i na ostale dve regije (centralna Srbija i vojvođanska regija).

5.2.2 Sadržaj aflatoksina M_1 u regijama

Analogno načinu prikazivanja rezultata za sadržaj AfB_1 u kukuruzu, i u slučaju mleka će se rezultati koji govore o sadržaju AfM_1 prikazivati u odnosu na dve MDK vrednosti: u obzir će najpre biti uzeta trenutno važeća nacionalna regulativa koja ograničava sadržaj AfM_1 u mleku na 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a potom će se predstaviti rezultati i na osnovu MDK vrednosti koja je propisana u EU od 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Sadržaj AfM_1 u mleku po regijama u odnosu na MDK vrednost od 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ je prikazan u tabeli 18.

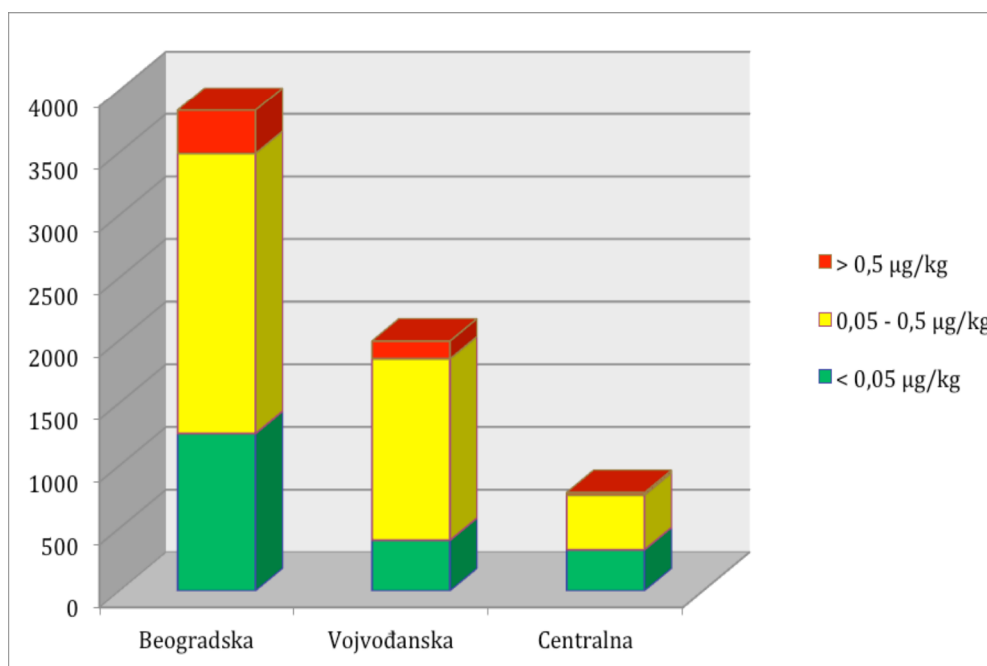
Tabela 18. Brojčana i procentualna zastupljenost uzoraka mleka koji sadrže AfM_1 u odnosu na MDK vrednost koja se primenjuje u Republici Srbiji

	Broj uzoraka (%) - beogradska regija	Broj uzoraka (%) - centralna Srbija	Broj uzoraka (%) - vojvođanska regija
$\leq 0,5 \mu\text{g}/\text{kg}$	3.491 (90,96%)	764 (97,45%)	1.861 (92,91%)
$> 0,5 \mu\text{g}/\text{kg}$	347 (9,05%)	20 (2,55%)	142 (7,09%)
Ukupno	3.838	784	2.003

Sadržaj AfM_1 u mleku po regijama u odnosu na MDK vrednost od 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ je prikazan u tabeli 19.

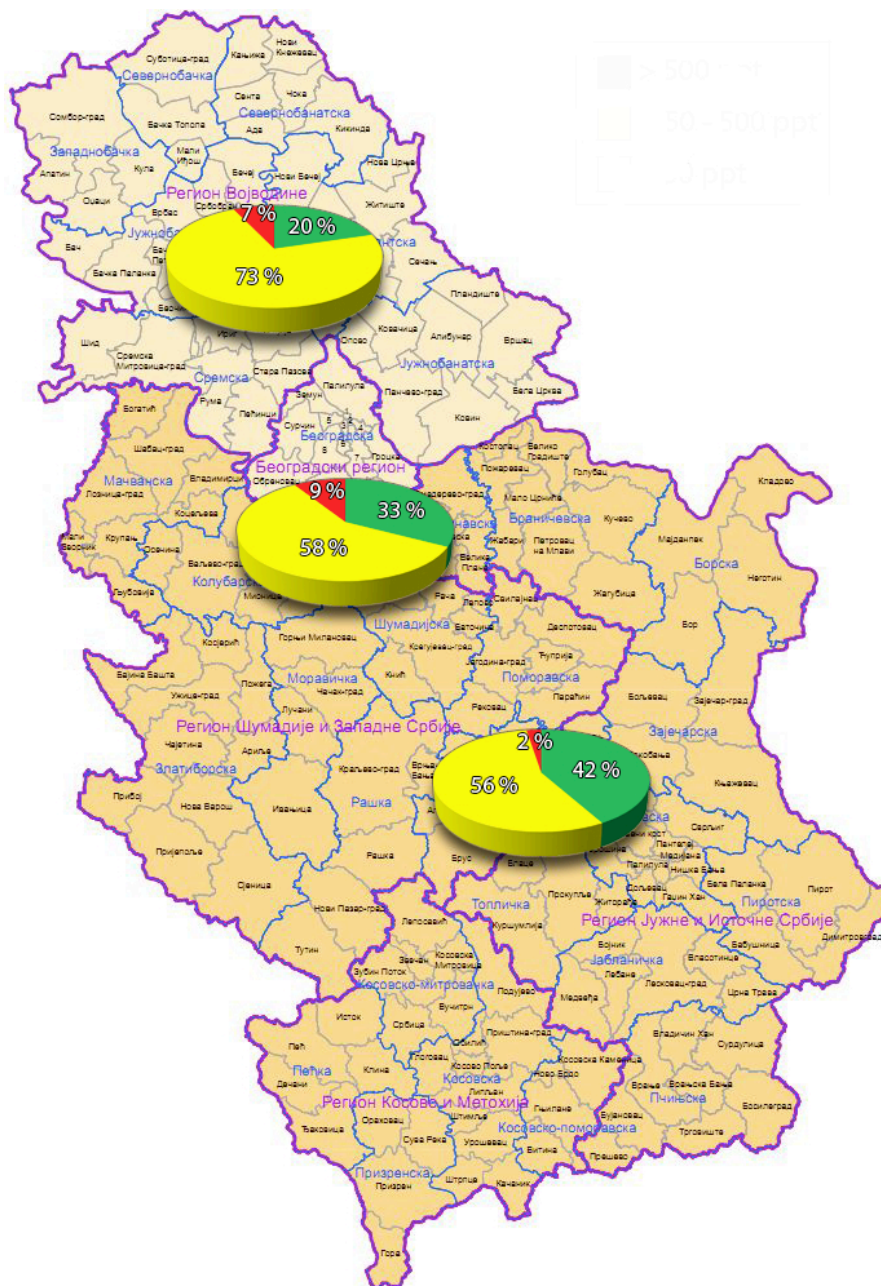
Tabela 19. Brojčana i procentualna zastupljenost uzoraka mleka koji sadrže AfM₁ u odnosu na MDK vrednost koja se koristi u EU

	Broj uzoraka (%) - beogradska regija	Broj uzoraka (%) - centralna Srbija	Broj uzoraka (%) - vojvođanska regija
≤ 0,05 µg/kg	1.255 (32,70%)	328 (41,84%)	404 (20,17%)
> 0,05 µg/kg	2.583 (67,30%)	456 (58,16%)	1.599 (79,83%)
Ukupno	3.838	784	2.003



Grafikon 17. Bar dijagram broja uzoraka mleka ispitanih na AfM₁ po regijama u odnosu na MDK vrednosti koje se primenjuju u Republici Srbiji i EU (crvena boja prikazuje prekoračenje MDK vrednosti preko 0,5 µg/kg, žuta boja prikazuje uzorke sa sadržajem AfB₁ između 0,05 i 0,5 µg/kg i zelena boja prikazuje uzorke sa sadržajem AfB₁ ispod 0,05 µg/kg).

Slika 16 prikazuje kartu Republike Srbije sa strukturnim krugovima za svaku regiju i procenat ispitanih uzoraka mleka na AfM₁ koji prekoračuju (crvena boja) nacionalni MDK, nalaze se između nacionalnog i EU MDK (žuta boja) ili zadovoljavaju (zelena boja) EU MDK vrednost.

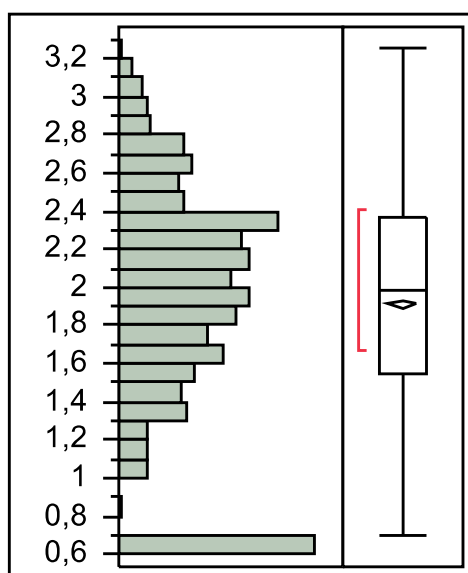


Slika 16. Objedinjeni prikaz sadržaja AfM₁ u mleku u Republici Srbiji u odnosu na MDK vrednosti koja se primenjuju u Republici Srbiji i EU

5.2.3 Distribucija aflatoksina M_1 kroz regije

U ovom poglavlju prikazana je distribucija AfM_1 u uzorcima mleka po regijama. Iz razloga koji su navedeni u poglavlju o distribuciji AfB_1 u kukuruzu, i ovde se pribeglo logaritmovanju dobijenih rezultata dekadnim logaritmom, što se vidi na priloženim histogramima. Podaci o prisustvu rezidua AfM_1 u mleku prikazani u tabelama predstavljaju apsolutne vrednosti koncentracija AfM_1 izražene u $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Grafikon 18 predstavlja histogram koji prikazuje distribuciju logaritamskih vrednosti koncentracija AfM_1 u uzorcima mleka uzetih na području beogradske regije. Desna strana grafikona predstavlja grafički prikaz parametara distribucije statističke serije podataka (minimalna i maksimalna vrednost, medijana standardna devijacija).

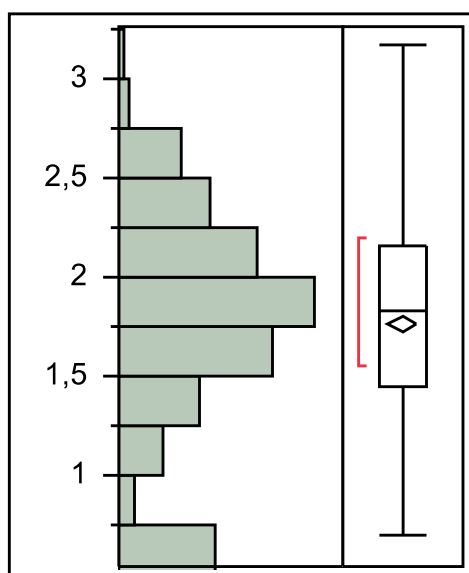


Grafikon 18. Distribucija vrednosti koncentracija AfM_1 u uzorcima mleka uzetih na području beogradske regije

Tabela 20. Prikaz statističkih parametara serije rezultata za AfM₁ u uzorcima mleka uzetih sa područja beogradske regije.

Broj uzoraka	3.838
Maksimalna vrednost (µg/kg AfM ₁)	1,778
Minimalna vrednost (µg/kg AfM ₁)	<0,005
Srednja vrednost (µg/kg AfM ₁)	0,184
Medijana (µg/kg AfM ₁)	0,095
Srednja vrednost u gornjem intervalu od 95% (µg/kg AfM ₁)	0,192
Srednja vrednost u donjem intervalu od 95% (µg/kg AfM ₁)	0,176

Grafikon 19 predstavlja histogram koji prikazuje distribuciju logaritamskih vrednosti koncentracija AfM₁ u uzorcima mleka uzetih na području centralne Srbije.

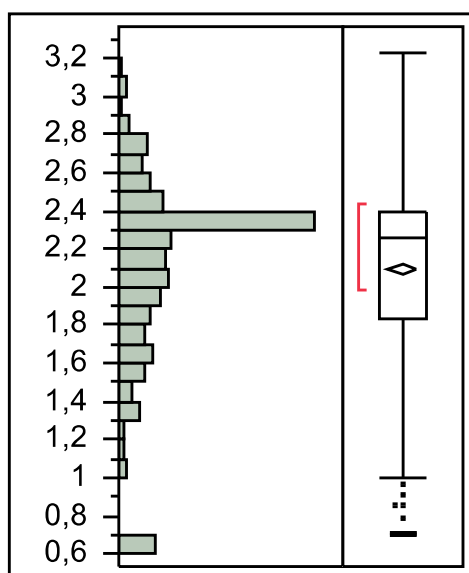


Grafikon 19. Distribucija vrednosti koncentracija AfM₁ u uzorcima mleka uzetih na području centralne Srbije

Tabela 21. Prikaz statističkih parametara serije rezultata za AfM₁ u uzorcima mleka uzetih sa područja centralne Srbije.

Broj uzoraka	784
Maksimalna vrednost (μg/kg AfM ₁)	1,475
Minimalna vrednost (μg/kg AfM ₁)	<0,005
Srednja vrednost (μg/kg AfM ₁)	0,117
Medijana (μg/kg AfM ₁)	0,067
Srednja vrednost u gornjem intervalu od 95% (μg/kg AfM ₁)	0,127
Srednja vrednost u donjem intervalu od 95% (μg/kg AfM ₁)	0,106

Grafikon 20 predstavlja histogram koji prikazuje distribuciju logaritamskih vrednosti koncentracija AfM₁ u uzorcima mleka uzetih na području vojvođanske regije.



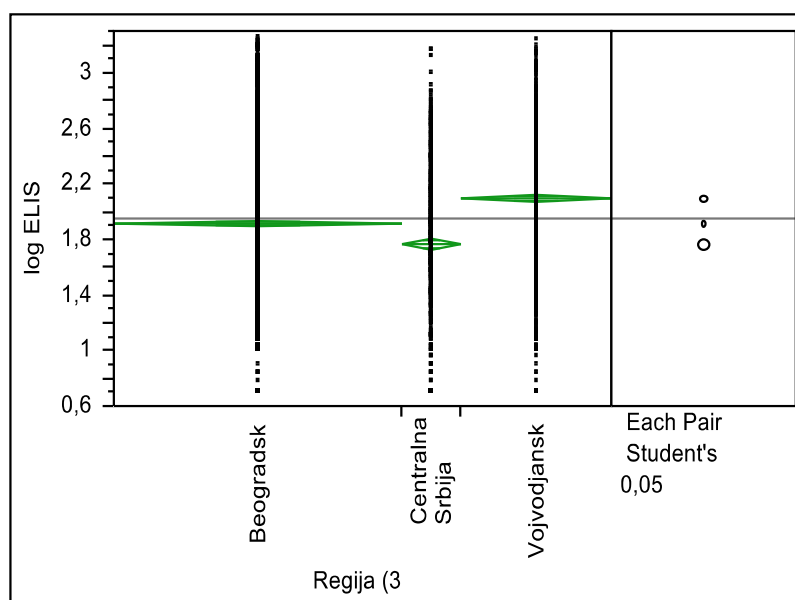
Grafikon 20. Distribucija vrednosti koncentracija AfM₁ u uzorcima mleka uzetih na području vojvođanske regije

Tabela 22. Prikaz statističkih parametara serije rezultata za AfM₁ u uzorcima mleka uzetih sa područja vojvođanske regije.

Broj uzoraka	2,003
Maksimalna vrednost (µg/kg AfM ₁)	1,71
Minimalna vrednost (µg/kg AfM ₁)	<0,005
Srednja vrednost (µg/kg AfM ₁)	0,205
Medijana (µg/kg AfM ₁)	0,179
Srednja vrednost u gornjem intervalu od 95% (µg/kg AfM ₁)	0,214
Srednja vrednost u donjem intervalu od 95% (µg/kg AfM ₁)	0,197

5.2.4 Značajnost razlika u sadržaju AfM₁

Grafikon 21 prikazuje rezultate analize varijanse, odnosno statističke značajnosti razlika u sadržaju AfM₁ u uzorcima kukuruza uzetih u tri regije (beogradska regija, centralna Srbija, vojvođanska regija). Imajući u vidu da se radi o statističkoj seriji diskretnih numeričkih vrednosti (koncentracija AfM₁ izražena u µg/kg), korišćena je jednofaktorska parametarska ANOVA. Poređenje značajnosti razlika između regija izvršeno je pomoću Studentovog t-testa.



Grafikon 21. Analiza varijanse za statističku seriju logaritmovanih vrednosti koncentracija AfM₁ u mleku u tri regije

Radi lakše interpretacije grafikona ponoviće se uputstvo za njegovo čitanje i na ovom mestu: grafikon 21 je podeljen na tri celine kojima odgovaraju tri regije u kojima je obavljano ispitivanje. Horizontalna linija koja deli ceo grafikon predstavlja srednju vrednost svih podataka. Svaka regija je predstavljena rombom zelene boje. Širina romba je proporcionalna broju uzoraka ispitanih na području jedne regije. Visina romba reprezentuje interval pouzdanosti koji iznosi 95%. Linija koja deli romb po horizontalnoj osi predstavlja srednju vrednost sadržaja AfM₁ po regiji. Gornja tačka svakog romba odgovara maksimalnoj vrednosti sadržaja AfM₁ u datoj regiji, dok donja tačka odgovara minimalnoj vrednosti.

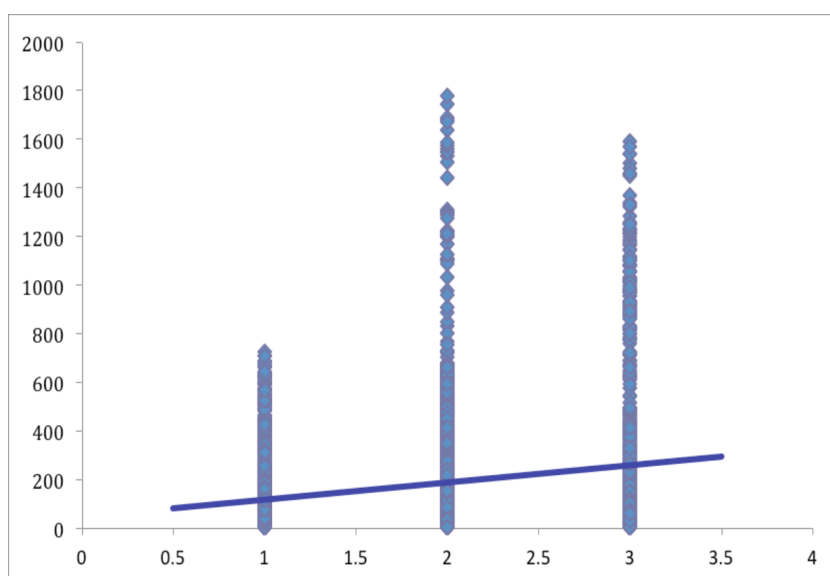
Krugovi sa desne strane grafikona predstavljaju grafički prikaz značajnosti razlika između rezultata analize AfM₁ u tri regije. Svaki krug odgovara jednoj regiji. Veličina prečnika kruga je proporcionalna broju analiziranih uzoraka u svakoj regiji. Statistička značajnost razlika je grafički prikazana preklapanjem ili razdvojenosti krugova. Što su krugovi razdvojeniji međusobno, razlike su

statistički značajnije. Ukoliko se krugovi u potpunosti preklapaju, statističke značajnosti nema.

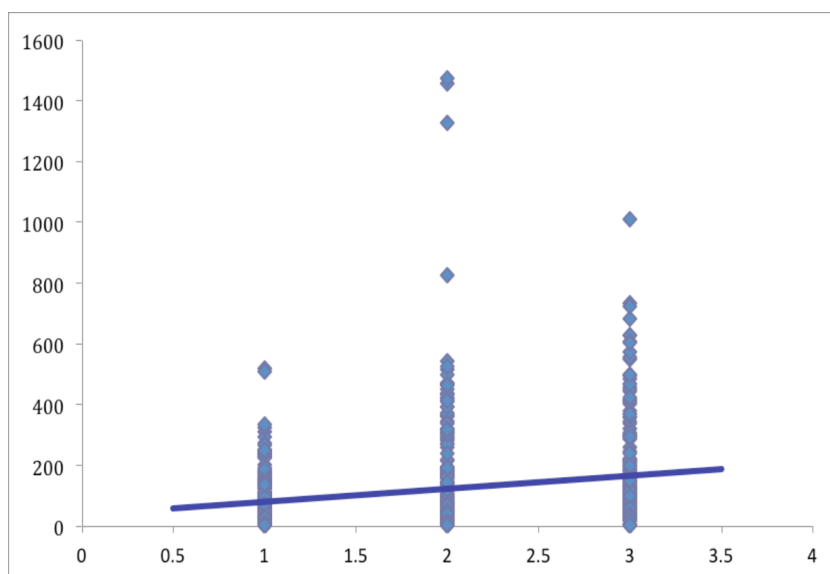
Sa grafikona 21 se može jasno videti da postoje veoma značajne razlike između sadržaja AfM₁ u uzorcima mleka uzetih iz tri regije u Republici Srbiji. Studentov t-test je pokazao da su razlike u sadržaju AfM₁ u mleku između sve tri regije (vojvođanske i centralne Srbije, vojvođanske i beogradske, kao i beogradske i centralne Srbije) veoma značajne ($p < 0,0001$ u sva tri slučaja). Ovi rezultati se slažu sa procentualnom zastupljenošću uzoraka sa prekoračenom MDK vrednosti za AfM₁ u mleku prikazanim u prethodnom poglavlju. Na osnovu iznetih podataka može se zaključiti da je prosečan sadržaj AfM₁ u Republici Srbiji bio najveći u uzorcima mleka uzetim sa područja vojvođanske regije, nešto manji u mleku uzetom sa područja beogradske regije a najmanji u uzorcima mleka uzetim sa područja centralne Srbije. Identično rangiranje postoji i u slučaju AfB₁ u kukuruzu, ali za razliku od AfB₁, razlike u sadržaju AfM₁ između regija su izraženije. Objašnjenje ovakvih rezultata delimično leži u činjenici da je broj uzoraka mleka daleko veći u odnosu na broj uzoraka kukuruza, ali i u tome da je distribucija AfM₁ u mleku po prirodi stvari ravnomernija u odnosu na AfB₁ u kukuruzu. Dokaz za ovu tvrdnju se može naći i u samom izgledu histograma distribucije koji u slučaju AfM₁ jasno pokazuju težnju ka Gausovoj raspodeli (normalna distribucija), dok a AfB₁ u kukuruzu to nije slučaj.

5.2.5 Promena sadržaja aflatoksina M_1 tokom vremena

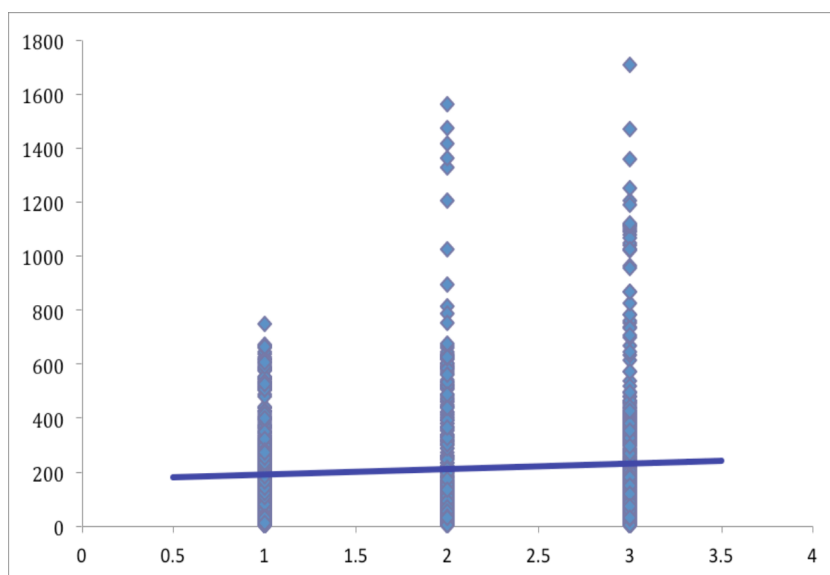
Analiza trenda kretanja sadržaja AfM_1 u uzorcima mleka uzetim tokom tri perioda u tri regije u Republici Srbiji izvedena je korišćenjem metode najmanjih kvadrata linearne regresije i linearnom ekstrapolacijom. Imajući u vidu rezultate analize trenda kretanja sadržaja AfB_1 u kukuruzu prikazane u prethodnom poglavlju, očekivani rezultati kretanja trenda za AfM_1 u mleku trebalo bi da prate rezultate za AfB_1 . Grafikoni 22, 23, 24 i 25 prikazuju trend promene koncentracije AfM_1 tokom tri perioda uzorkovanja u beogradskoj regiji, centralnoj Srbiji, vojvođanskoj regiji i na nivou cele Republike Srbije.



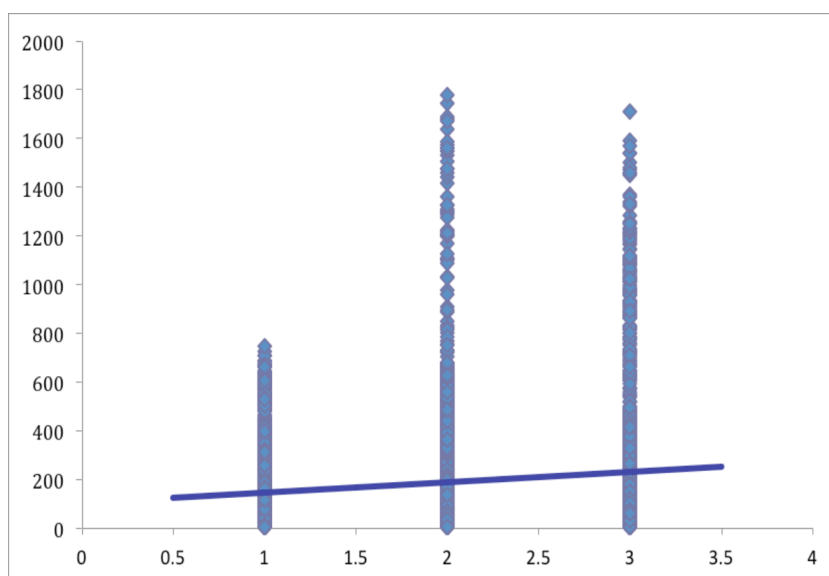
Grafikon 22. Trend promene sadržaja AfM_1 u mleku uzorkovanom sa područja beogradske regije (x-osa predstavlja periode; y-osa predstavlja sadržaj AfM_1 u mleku izražen u ng/kg). Jednačina linije trenda je $y=70,842*x+46,661$



Grafikon 23. Trend promene sadržaja AfM₁ u mleku uzorkovanom sa područja centralne Srbije (x-osa predstavlja periode; y-osa predstavlja sadržaj AfM₁ u mleku izražen u ng/kg). Jednačina linije trenda je $y=43,311*x+37,682$



Grafikon 24. Trend promene sadržaja AfM₁ u mleku uzorkovanom sa područja vojvodanske regije (x-osa predstavlja periode; y-osa predstavlja sadržaj AfM₁ u mleku izražen u ng/kg). Jednačina linije trenda je $y=20,494*x+170,8$



Grafikon 25. Trend promene sadržaja AfM₁ u mleku uzorkovanom sa područja cele Republike Srbije (x-osa predstavlja periode; y-osa predstavlja sadržaj AfM₁ u mleku izražen u ng/kg). Jednačina linije trenda je $y=42,539 \cdot x+103,9$

Sa grafikona se jasno može videti da linija trenda izvedena na osnovu tri perioda uzorkovanja ukazuje na rast sadržaja AfM₁ u mleku kako u pojedinim regijama, tako i na nivou cele zemlje. Takođe, kao što je i očekivano, trend AfM₁ prati trend AfB₁ koji, kao što je ranije naglašeno, nastaje zbog pojave sekundarne kontaminacije kukuruza sa AfB₁ prilikom skladištenja. Ipak, može se uočiti da su linije trenda za AfM₁ manje strme u odnosu na AfB₁. I ovoj pojavi će se više pažnje posvetiti u diskusiji, ali na ovom mestu treba reći da jedno od objašnjenja za ovakve rezultate može da bude niz mera koje se preduzimaju za smanjenje nivoa rezidua AfM₁ u mleku od strane regulatornih tela i učesnika u lancu proizvodnje i prometa mleka u Republici Srbiji.

5.3 Validacija UPLC/MS-MS metoda za određivanje sadržaja aflatoksina B₁ u kukuruzu i aflatoksina M₁ u mleku - poređenje ELISA i UPLC-MS/MS metoda

5.3.1 Validacija UPLC/MS-MS metode za određivanje aflatoksina B₁ u kukuruzu

U ovom poglavlju biće prikazani rezultati koji se odnose na validaciju UPLC/MS-MS metode za određivanje AfB₁ u kukuruzu. Validacija je sprovedena na nivou MDK koji se primenjuje u EU od 20 µg/kg.

Tabela 23. Elementi jednačine prave i koeficijenti determinacije kalibracionih pravih dobijenih iz tri eksperimenta.

	Jednačina prave ($y = ax + b$)		
	Nagib (a)	Odsečak (b)	r ²
Eksperiment 1	130,801	3,618	0,9908
Eksperiment 2	124,633	9,294	0,9970
Eksperiment 3	129,851	2,559	0,9969

Tabela 24. Tačnost metode izražena u procentima kao i standardna devijacija za prva tri eksperimenta

Nivo validacije	Eksperiment 1	Eksperiment 2	Eksperiment 3	Eksperiment 1	Eksperiment 2	Eksperiment 3
	Tačnost (%)	Tačnost (%)	Tačnost (%)	SD (%)	SD (%)	SD (%)
0,5 MDK	5,2	5,4	4,7	0,5	0,5	0,5
1 MDK	5,1	5,0	4,7	0,4	0,3	0,4
1,5 MDK	5,2	5,2	4,9	0,5	0,4	0,2

Tabela 25. Koeficijenti varijacije ponavljanja u prva tri eksperimenta

Nivo validacije	Eksperiment 1	Eksperiment 2	Eksperiment 3
	C.V. (%)	C.V. (%)	C.V. (%)
0,5 MDK	9,6	10,0	10,0
1 MDK	8,0	7,0	8,1
1,5 MDK	10,6	7,2	4,0

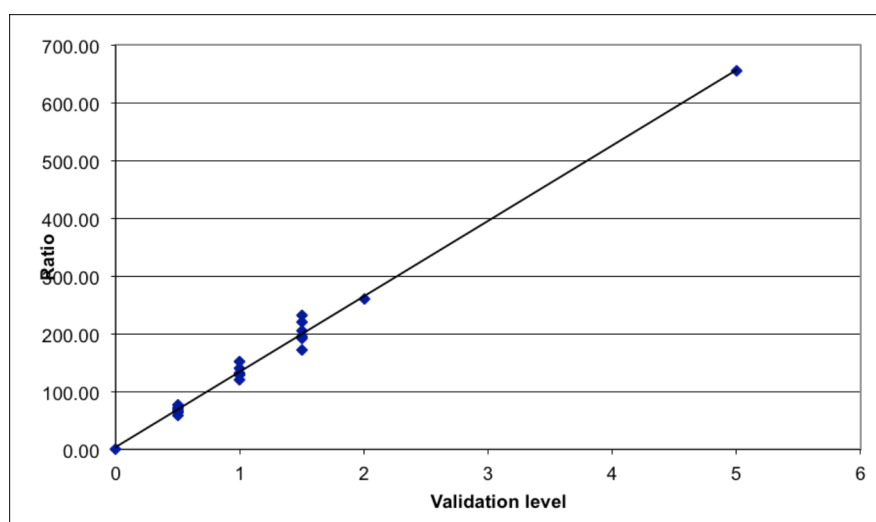
Tabela 26. Kritične vrednosti metode (granica odluke - $CC\alpha$ i sposobnost detekcije - $CC\beta$)

	$CC\alpha$	$CC\beta$
	ng/g	ng/g
Eksperiment 1	0,08	0,14
Eksperiment 2	0,15	0,26
Eksperiment 3	0,05	0,08
Prosečna vrednost	0,09	0,16

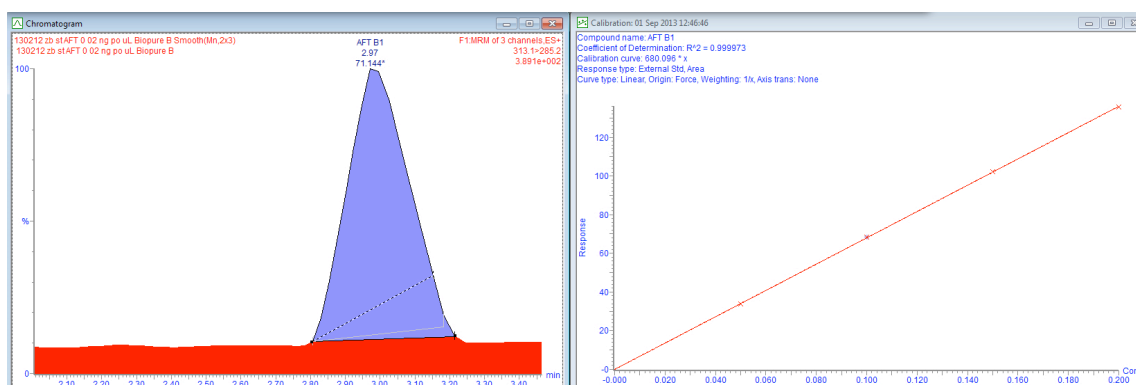
Tabela 27. Koeficijent varijacije iz eksperimenta 4.

Nivo validacije	Tačnost (%)	SD (%)	C.V. (%)
1 MDK	4,9	0,2	4,0

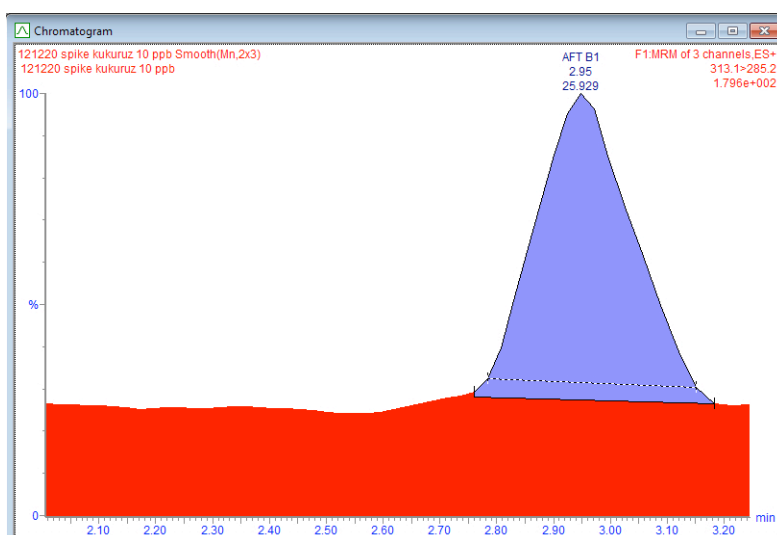
Prinos metode se kreće od 81,2% do 93,5%.



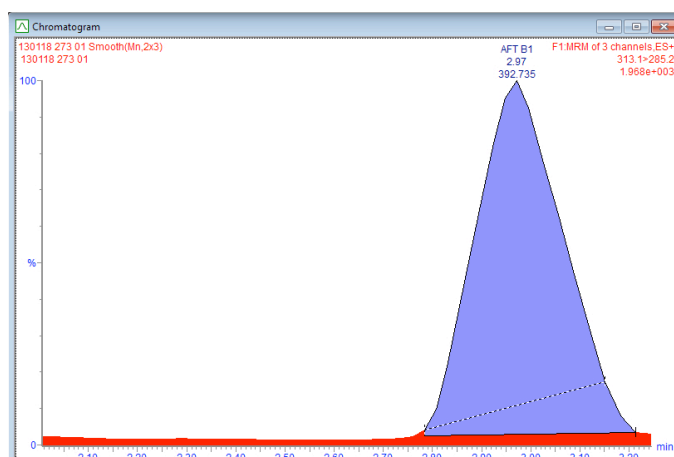
Grafikon 26. Kalibraciona prava obogaćenih slepih proba na 5 nivoa obogaćenja.



Slika 17. Hromatogram standarda AfB₁ u koncentraciji od 0,020 ng/mL i kalibraciona prava izvedena u 5 tačaka uključujući i nulu. Prikazana je kvantifikaciona tranzicija AfB₁ 313,1>285,2 Da. Koeficijent korelacije kalibracione prave iznosio je 0,9999.



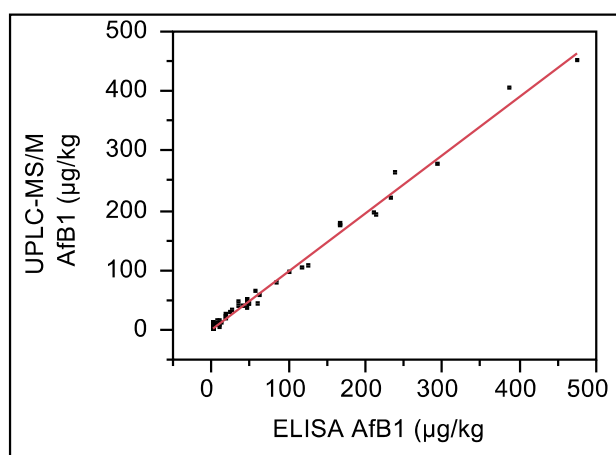
Slika 18. Hromatogram blanko uzorka kukuruza obogaćenog standardom AfB₁ na nivou od 10 µg/kg. Prikazana je kvantifikaciona tranzicija AfB₁ 313,1>285,2 Da



Slika 19. Hromatogram ekstremno visokog nivoa AfB₁ u jednom uzorku kukuruza uzetom sa područja centralne Srbije od 560 µg/kg. Prikazana je kvantifikaciona tranzicija AfB₁ 313,1>285,2 Da

5.3.2 Poređenje ELISA i UPLC-MS/MS metode za određivanje aflatoksina B₁ u kukuruza

Poređenje dve analitičke tehnike (ELISA i UPLC-MS/MS) je izvedeno analiziranjem 100 istovetnih uzoraka kukuruza. Dve serije podataka su zatim korelirane metodom linearne regresije.



Grafikon 27. Regresiona kriva korelacije između ELISA i UPLC-MS/MS metode za određivanje AfB₁ u kukuruza.

Jednačina prave izvedena iz linearne regresije glasi:

$$y=0,9749*x+0,214$$

Koeficijent determinacije (r^2) između dve metode je veoma visok i iznosi 0,994 što ukazuje na visok stepen slaganja rezultata dobijenih korišćenjem ovih metoda.

5.3.3 Validacija UPLC-MS/MS metode za određivanje aflatoksina M_1 u mleku

U ovom poglavlju biće prikazani rezultati koji se odnose na validaciju UPLC-MS/MS metode za određivanje AfM_1 u mleku. Validacija je sprovedena na nivou MDK koji se primenjuje u EU od 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Tabela 28. Elementi jednačine prave i koeficijenti determinacije kalibracionih pravih dobijenih iz tri eksperimenta.

Jednačina prave ($y = ax + b$)			
	Nagib (a)	Odsečak (b)	r^2
Eksperiment 1	52,603	-6,383	0,9896
Eksperiment 2	87,434	-11,088	0,9762
Eksperiment 3	79,909	-2,559	0,9841

Tabela 29. Tačnost metode izražena u procentima i standardna devijacija za prva tri eksperimenta

Nivo validacije	Eksperiment 1	Eksperiment 2	Eksperiment 3	Eksperiment 1	Eksperiment 2	Eksperiment 3
	Tačnost (%)	Tačnost (%)	Tačnost (%)	SD (%)	SD (%)	SD (%)
0,5 MDK	0,8	1,0	0,8	0,5	0,1	0,1
1 MDK	0,6	0,9	0,9	0,2	0,3	0,1
1,5 MDK	0,5	0,8	0,7	1	0,5	0,3

Tabela 30. Koeficijenti varijacije ponavljanja u prva tri eksperimenta

Nivo validacije	Eksperiment 1	Eksperiment 2	Eksperiment 3
	C.V. (%)	C.V. (%)	C.V. (%)
0,5 MDK	5,1	10,0	15,0
1 MDK	6,5	8,2	6,3
1,5 MDK	1,6	6,3	6,4

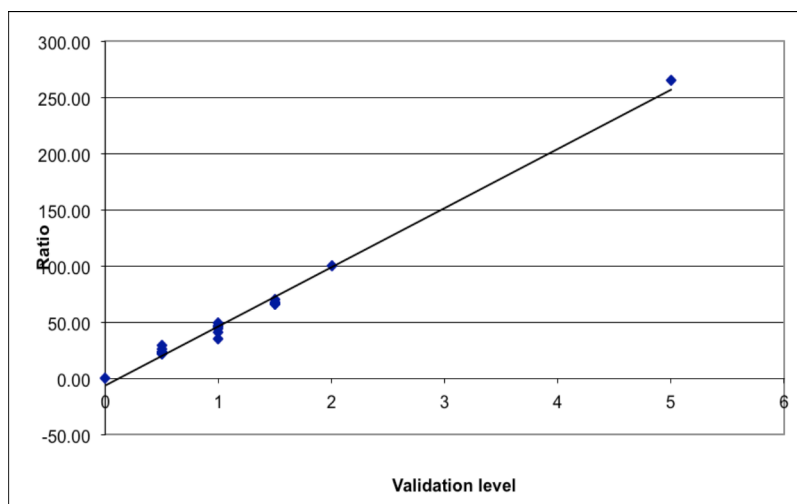
Tabela 31. Kritične vrednosti metode (granica odluke - $CC\alpha$ i sposobnost detekcije - $CC\beta$)

	$CC\alpha$	$CC\beta$
	ng/g	ng/g
Eksperiment 1	0,08	0,16
Eksperiment 2	0,13	0,22
Eksperiment 3	0,10	0,18
Prosečna vrednost	0,11	0,18

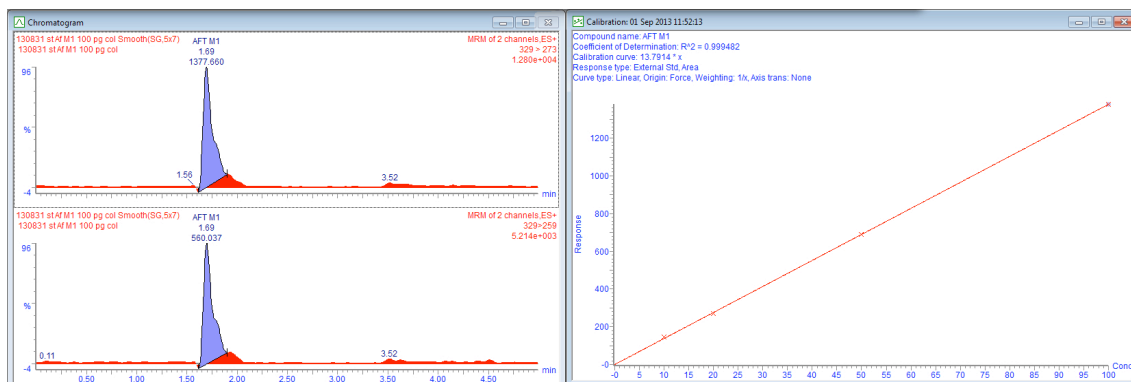
Tabela 32. Koeficijent varijacije iz eksperimenta 4.

Nivo validacije	Tačnost (%)	SD (%)	C.V. (%)
1 MDK	5,2	0,3	3,5

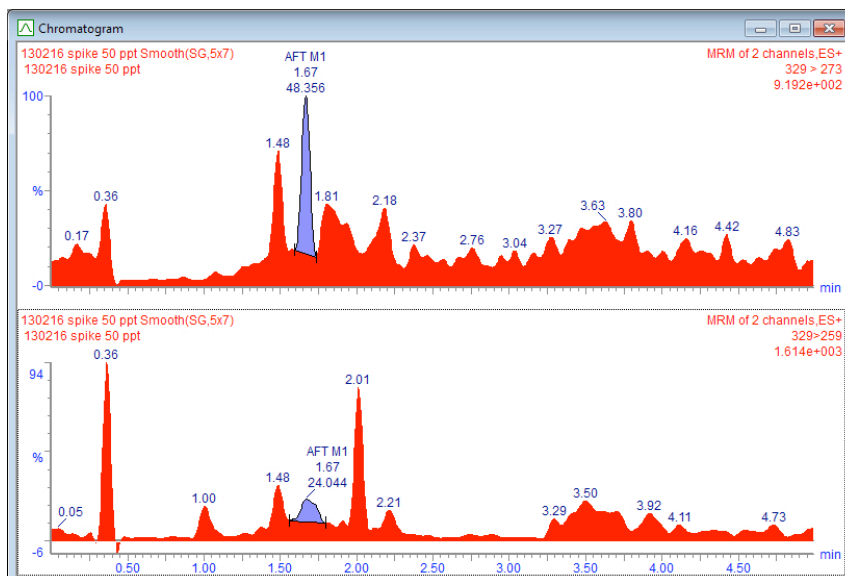
Prinos metode se kreće od 75,3% do 89,2%.



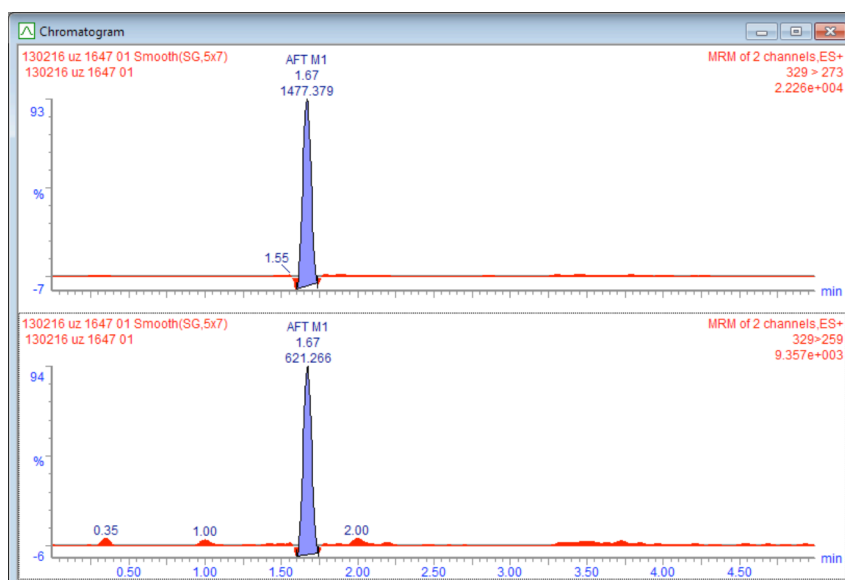
Grafikon 28. Kalibraciona kriva obogaćenih slepih proba mleka na 5 nivoa obogaćenja.



Slika 20. Hromatogram standarda AfM1 u koncentraciji od 10 ng/mL i kalibraciona prava izvedena u 5 tačka uključujući i nulu. Prikazana je kvantifikaciona tranzicija AfM₁ 329>273 Da i kvalifikaciona tranzicija 329>259 Da. Koeficijent korelacije kalibracione prave iznosio je 0,9999.



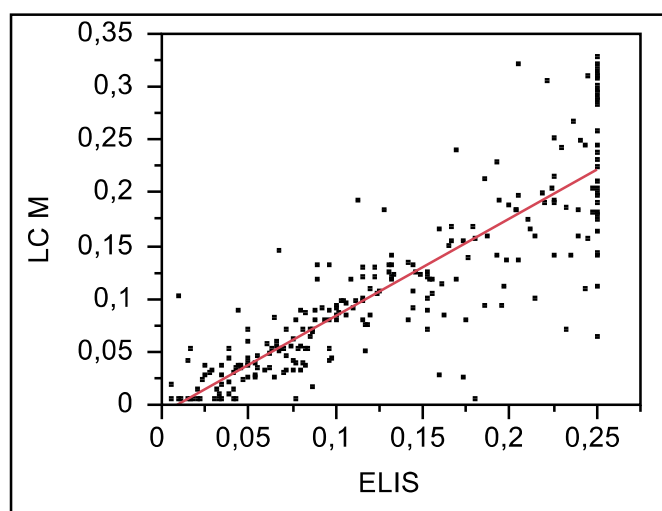
Slika 21. Hromatogram blanko uzorka mleka obogaćenog standardom AfM₁ na nivou od 0,05 µg/kg. Prikazana je kvantifikaciona tranzicija AfM₁ 329>273 Da i kvalifikaciona tranzicija 329>259 Da.



Slika 22. Hromatogram ekstremno visokog nivoa AfM₁ u jednom uzorku mleka uzetom sa područja beogradske regije od 1,78 µg/kg. Prikazana je kvantifikaciona tranzicija AfM₁ 329>273 Da i kvalifikaciona tranzicija 329>259 Da.

5.3.4 Poređenje ELISA i UPLC-MS/MS metode za određivanje aflatoksina M₁ u mleku

Poređenje dve analitičke tehnike (ELISA i UPLC-MS/MS) je izvedeno analiziranjem 250 istovetnih uzoraka kukuruza. Dve serije podataka su zatim korelirane metodom linearne regresije.



Grafikon 29. Regresiona kriva korelacije između ELISA i UPLC-MS/MS metode za određivanje AfM₁ u mleku.

Jednačina prave izvedena iz linearne regresije glasi:

$$y=0,9201*x-0,0082$$

Koeficijent determinacije (r^2) između dve metode je veoma visok i iznosi 0,9201 što ukazuje na visok stepen slaganja rezultata dobijenih korišćenjem ovih metoda.

6. DISKUSIJA

Poglavlje diskusije je zbog bolje preglednosti, podeljeno na podpoglavlja prema ciljevima istraživanja. Diskusijom ćemo najpre obuhvatiti rezultate koji se odnose na AfB₁ u kukuruzu, potom rezultate koji se odnose na AfM₁ u mleku, dok će se završni deo odnositi na parametre UPLC-MS/MS analitičkih metoda za određivanje AfB₁ u kukuruzu i AfM₁ u mleku, kao i poređenje ELISA i UPLC-MS/MS analitičkih tehnika.

6.1 Aflatoksin B₁ u kukuruzu

Pre diskusije rezultata koji se odnose na sadržaj i distribuciju AfB₁ u uzorcima kukuruza, treba se osvrnuti na značaj koji ova poljoprivredna kultura ima u Republici Srbiji, kao i na razloge koji su uzrokovali visoki stepen kontaminacije kukuruza AfB₁, kao i posledičnu pojavu rezidua AfM₁ u mleku tokom 2012. i 2013. godine.

Prema zvaničnim statističkim podacima, kukuruz zauzima prvo mesto među 10 najvažnijih proizvoda u spoljnotrgovinskoj razmeni, sa novčanom vrednošću izvoza od 537.000.000 američkih dolara, što iznosi oko 4,7% ukupnog izvoza Republike Srbije (Statistički kalendar Republike Srbije, 2013). Ovaj podatak dovoljno govori o značaju koji proizvodnja kukuruza ima u našoj zemlji. Sa druge strane infestacija poljoprivrednih kultura plesnima roda *Aspergillus*, i posledična kontaminacija AfB₁, se prema raspoloživim literaturnim podacima, sve do nedavno nije smatrala ozbiljnim problemom u zemljama evropskog kontinenta, te je pažnja

vezana za kontrolu prisustva AfB₁ u hrani i hrani za životinje uglavnom bila usmerena na proizvode iz uvoza, i to iz zemalja sa tropskom i mediteranskom klimom, koja pogoduje rastu i razmnožavanju *Aspergillus* vrsta plesni (EFSA, 2004).

Međutim, klimatske promene koje su poslednjih decenija sve prisutnije i na evropskom kontinentu, i pojava veoma toplih i sušnih letnjih perioda, aktuelizovali su i pitanje infestacije žitarica plesnima iz roda *Aspergillus* u Evropi, naročito u zemljama mediteranskog dela Evrope, jugoistočne Evrope i Balkanskog poluostrva. Evropska Agencija za bezbednost hrane (EFSA) je stoga inicirala izradu studije pod naslovom: "Modelovanje, predviđanje i mapiranje pojave aflatoksina u žitaricama u EU usled klimatskih promena" (EFSA, 2012). Ova studija jasno ukazuje na realnu opasnost od pojave aflatoksina u žitaricama u navedenim zemljama u slučaju globalnog porasta srednje godišnje temperature. Kao posledica dugih, toplih i sušnih leta, rizik od pojave aflatoksina, predviđa se u pogođenim zemljama, ukoliko rast srednje godišnje temperature bude iznosio 5°C.

Republika Srbija je u leto 2012. godine zabeležila najveću sušu od kako se sprovodi praćenje vremenskih prilika (RHMZ, 2013). Odstupanja srednjih maksimalnih temperatura tokom leta 2012. godine iznosila su 3,5-5°C, a na planinama i do 6°C. Ukoliko ove podatke uporedimo sa podacima iz studije EFSA, postaje jasno da su se stekli uslovi za pojavu aflatoksina u kukuruzu u Republici Srbiji tokom 2012. godine.

Sa druge strane, regulativa koja propisuje maksimalno dozvoljene količine (MDK) za AfB₁ u hranivima u Republici Srbiji (Sl. glasnik RS broj 4/10), nije usklađena sa analognim propisom koji se primenjuje u EU (Commission Decision 2002/32/EU). MDK vrednost za AfB₁ u našem pravilniku o kvalitetu hrane za životinje za hraniva iznosi 50 µg/kg, odnosno 10 µg/kg za potpune smeše za ishranu mlečnih krava, dok EU propis limitira AfB₁ na 20 µg/kg u hranivima, odnosno 5 µg/kg u potpunim smešama za ishranu mlečnih krava. Poštovanjem MDK vrednosti za AfB₁ od 20 µg/kg u hranivima i 5 µg/kg u potpunim smešama za

ishranu mlečnih krava sa sigurnošću se može izbeći pojava rezidua AfM₁ u mleku preko dozvoljene granice od 0,05 µg/kg mleka. (EFSA, 2004). Zbog toga je važno uspostavljanje nacionalnih programa kontinuiranog praćenja (monitoring) kukuruza i potpunih smeša namenjenih ishrani mlečnih krava na prisustvo neželjenih supstanci, uključujući i mikotoksine.

Sve navedene okolnosti, uticale su na to da se zabeleži pojava AfB₁ u kukuruza u Republici Srbiji u 2012. godini, i da se posledično utvrdi pojava AfM₁ u mleku u 2012. i 2013. godini.

6.1.1 Sadržaj aflatoksina B₁ po regijama

Dobijeni rezultati koji se odnose na prisustvo AfB₁ u kukuruza ukazuju na visoki stepen kontaminacije ovim mikotoksinom. Ukupno je ispitano 680 uzoraka kukuruza u tri regije Republike Srbije. Utvrđeno je da je nacionalnu MDK vrednost za AfB₁ prekoračilo 20,77%, 22,49% i 29,73% uzoraka analiziranih sa područja beogradske regije, centralne Srbije i vojvođanske regije, dok je MDK za AfB₁ koji se primenjuje u EU prekoračilo 37,66%, 30,76% i čak 44,93% uzoraka iz navedenih regija. Maksimalne zabeležene vrednosti AfB₁ bile su 215 µg/kg, 560 µg/kg i 475 µg/kg u beogradskoj regiji, centralnoj Srbiji i vojvođanskoj regiji. Srednje vrednosti u sadržaja AfB₁ u ove tri regije su iznosile 28,06 µg/kg, 29,1 µg/kg i 33,21 µg/kg.

Vrednosti AfB₁ koje smo dobili u okviru naših istraživanja bile su više od vrednosti AfB₁ prikazanih u nama dostupne dve studije sa prostora Republike Srbije. U navedenim studijama u pozitivnim uzorcima kukuruza utvrđeno je prisustvo AfB₁ u koncentraciji od 40 do 100 µg/kg (Bočarov-Stančić i sar, 2000) dok su Mašić i sar, 2003) u drugoj studiji prikazali kontaminaciju sa AfB₁ u 10,43% od 585 ispitivanih uzoraka kukuruza.

Rezultati dobijeni u našim istraživanjima, a koji se odnose na sadržaj AfB₁ u ispitivanim uzorcima kukuruza, saglasni su rezultatima koje su predstavili

istraživači iz Turske (Alperden i sar, 1990; Alptekin i sar, 2009; Giray i sar, 2009; Gursoy i Bicici, 2003; Nizamlyodlu i Oguz, 2003; Oruc i sar, 2006; Oruc i sar, 2007; Ozay i Heperkan, 1989). Zbirni prikaz rezultata ovih autora ukazuje na sličan obim kontaminacije kukuruza sa maksimalnom zabeleženom koncentracijom AfB₁ od 432 µg/kg, dok su prosečne vrednosti iznosile 37,6 µg/kg. Većina analiziranih uzoraka potiče iz mediteranskog dela Turske.

Poređenje naših rezultata sa rezultatima koje su predstavili italijanski autori, naročito u radovima objavljenim nakon 2003. godine koja je u Italiji bila pogođena sušom, bez padavina u periodu od maja do septembra (AA, VV, 2005; Battiliani i sar, 2008; Cinti i sar, 2005) ukazuje na nižu kontaminaciju kukuruza u ovoj zemlji. U navedenim studijama, najviša vrednost AfB₁ u kukuruzu zabeležena je u jednom uzorku iz doline reke Po i iznosila je 233 µg/kg, sa srednjim vrednostima od 21 µg/kg i 14 µg/kg. Studija koju su objavili Decastelli i sar, 2005, prikazuje 541 analizirani uzorak više vrsta hraniva uzetih u periodu 2004-2005. godine. Najviša kontaminacija AfB₁ utvrđena je u uzorcima kukuruza i iznosila je 63,6%. Autori studije nisu prikazali izmerene koncentracije, već samo njihovo procentualno učešće u ispitivanim uzorcima.

U Rumuniji, koja je jedan od vodećih proizvođača kukuruza u Evropi, Tabuc i sar. (2009) su utvrdili daleko niže vrednosti sadržaja AfB₁ u kukuruzu. Maksimalna izmerena vrednost iznosila je 46,4 µg/kg. Ipak, treba naglasiti da su ove vrednosti dobijene u godinama koje se nisu karakterisale sušnim periodima, što svakako objašnjava niži sadržaj AfB₁ u kukuruzu u odnosu na naša istraživanja.

Studija objavljena u Iranu (Karami-Osboo i sar, 2012) prikazuje daleko više vrednosti sadržaja AfB₁ u kukuruzu u odnosu na rezultate koje smo mi prikazali. U periodu od 2006. do 2008. godine, ukupno je analizirano 373 uzoraka, što je oko polovine broja uzoraka analiziranih u toku naših ipitivanja. Kontaminacija AfB₁ je zabeležena u 43,6% uzoraka sa srednjim vrednostima izmerenim u najsušnijoj (2008.) godini od 209,07 µg/kg, dok su srednje vrednosti u 2006. i 2007. godini

bile daleko niže i iznosile su od 6 µg/kg do 150 µg/kg u zavisnosti od pokrajine u kojoj su uzimani uzorci. Ove vrednosti saglasne su sa našim rezultatima imajući u vidu redovne klimatske prilike u toj zemlji.

Takođe, istraživanja sprovedena u SAD, nakon katastrofalne suše, koja je pogodila jug ove zemlje (država Arkanzas) u leto 1998. godine (Abbas i sar, 2006; Williams, 1999; Windham, 1999), saglasna su rezultatima naših ispitivanja. Maksimalna koncentracija AFB₁ u ispitivanim uzorcima kukuruza iznosila je 699 µg/kg dok je zabeležena srednja vrednost bila viša od one koju smo mi izmerili i iznosila je 221 µg/kg.

Studije objavljene u drugim evropskim zemljama: Francuskoj 1999. godine (Scudamore i Patel, 2000), Hrvatskoj 1979. godine (Pepeljnak i Blazer, 1982), Kipru 1997., 1998. i 2003 godine (Ionnou-Kakuori i sar, 2004), Češkoj, Španiji i Portugalu 2008. godine (Monbaliu i sar, 2008), kao i još jedna studija u Španiji (Munoz i sar, 1990), nisu zabeležile prisustvo AFB₁ u kukuruзу.

Iz svega do sada prikazanog može se zaključiti da presudnu ulogu u kontaminaciji kukuruza sa AFB₁ imaju klimatski faktori. Studije iz različitih zemalja jasno ukazuju na kontaminaciju kukuruza ovim toksinom ili u zemljama koje se i inače karakterišu toplom klimom, ili u zemljama gde su zabeležene suše usled klimatskih promena. Značajno prisustvo AFB₁ u kukuruзу nije zabeleženo u evropskim zemljama koje ne pripadaju mediteranskom pojasu i u kojima nije bilo toplih i sušnih leta (Nemačka, Holandija, Francuska), ili je kontaminacija bila minimalna i daleko ispod propisanih MDK vrednosti za AFB₁.

6.1.2 Distribucija aflatoksina kroz regije

Iz prikazanih rezultata, koji se odnose na distribuciju AFB₁ u kukuruзу u tri regije Republike Srbije, nisu utvrđene statistički značajne razlike, osim pri poređenju sadržaja AFB₁ u uzorcima kukuruza uzetih sa područja vojvođanske

regije i centralne Srbije ($p=0,0002$). Odsustvo statistički značajnih razlika se može objasniti činjenicom da su izuzetno nepovoljne vremenske prilike, koje su se manifestovale velikom sušom u leto 2012. godine, pogodile istim intenzitetom celu Republiku Srbiju o čemu jasno govore zvanični podaci (RHMZ, 2013). Sa druge strane, prisustvo statistički značajnih razlika između vojvođanske regije i centralne Srbije može da se objasni velikim razlikama između ovih regija u pogledu obima proizvodnje kukuruza. Proizvodni i skladišni kapaciteti u AP Vojvodina su daleko veći od onih na području centralne Srbije (Statistički kalendar Republike Srbije, 2013), pa je i najveći deo kontaminacije kukuruza prisutan upravo u vojvođanskoj regiji. Analiza varijanse sprovedena na sadržaju AfB₁ u kukuruзу po definisanim regijama, potvrđuje ove navode, a najviša srednja vrednost koncentracija AfB₁ je zabeležena upravo na području vojvođanske regije.

Ukoliko se pogledaju dijagrami distribucije (histogrami), prikazani u poglavlju rezultata ove disertacije, može se zaključiti da raspodela koncentracija AfB₁ u svim regijama ne ukazuje na očekivani matematički model normalne distribucije. Ukoliko bismo eliminisali uzorke u kojima prisustvo AfB₁ nije ustanovljeno, očekivana distribucija pozitivnih uzoraka bi trebalo da teži normalnoj raspodeli, odnosno da se povezivanjem središnjih tačaka svakog elementa histograma dobije Gausova kriva. Iako se ova tendencija može uočiti iz prikazanih rezultata, ona ipak nije toliko očigledna kao što je to slučaj sa rezultatima uzoraka mleka. Objašnjenje za ovu pojavu leži u ranije spomenutoj heterogenosti raspodele AfB₁ u kukuruзу o čemu svedoče brojne studije (Hamilton, 1978; Whittaker, 2003; Whittaker, 2006; Bryden, 2012). Iz ovog razloga treba još jednom ponoviti veliki značaj pravilnog uzorkovanja biljnog materijala uopšte, pa i kukuruza na prisustvo mikotoksina. Uzorkovanje kukuruza, za izvođenje eksperimentalnog dela ove disertacije, izvedeno je uz poštovanje kriterijuma zadatih u relevantnim propisima EU (401/2006/EC), zbog odsustva domaće regulative. Iako su ispoštovani složeni kriterijumi za uzorkovanje iz ove direktive distribucija vrednosti koncentracija AfB₁ u uzorcima kukuruza ne

pokazuje stepen normalnosti koji se može uočiti kod distribucije uzoraka mleka, gde je raspodela AfM₁ daleko uniformnija zahvaljujući njegovoj pravilnoj raspodeli u mleku.

6.1.3 Promena sadržaja aflatoksina B₁ tokom vremena

Osnovni cilj ispitivanja sadržaja AfB₁ u kukuruзу tokom dva perioda bio je da se utvrdi ili ospori pojava sekundarne kontaminacije tokom skladištenja. Sekundarna kontaminacija je u literaturi dobro opisan fenomen koji nastaje kao posledica daljeg razmnožavanja plesni roda *Aspergillus* u skladišnim prostorima, prvenstveno silosima, ukoliko u ovim prostorima vladaju povoljni mikroklimatski uslovi koji pogoduju rastu plesni i produkciji mikotoksina (Bryden, 2012). U takvim okolnostima dolazi do daljeg porasta broja plesni i posledično do porasta koncentracije AfB₁ u kukuruзу tokom skladištenja. Ekspertsko mišljenje evropske Agencije za bezbednost hrane (EFSA, 2012) u svojim zaključcima u pogledu rizika od pojave AfB₁ u žitaricama navodi da “sadržaj AfB₁ može drastično da se uveća ukoliko se nakon žetve, faze sušenja i skladištenja kukuruza neadekvatno sprovode”.

Naši rezultati u pogledu kretanja sadržaja AfB₁ u uzorcima kukuruza, tokom dva perioda ispitivanja, nažalost nedvosmisleno potvrđuju ove navode. Linije trenda pokazuju rast koncentracije AfB₁ u kukuruзу u sve tri regije zasebno, kao i na zbirnoj analizi na nivou cele Republike Srbije. Najintenzivniji rast sadržaja AfB₁ zabeležen je u uzorcima kukuruza sa područja vojvođanske regije, zatim centralne Srbije, dok je linija trenda najblaža u uzorcima kukuruza poreklom iz beogradske regije. Ovo je u skladu sa podacima o intenzitetu kontaminacije, prikazanim u prethodnom poglavlju. Treba naglasiti da, iako je linija trenda najstrmija u uzorcima kukuruza uzorkovanih u centralnoj Srbiji, srednja koncentracija AfB₁ u prvom periodu je najniža, što objašnjava naizgled najintenzivniji rast koncentracija AfB₁ u ovoj regiji.

Iz svega do sada izloženog, može se zaključiti da je kontaminacija kukuruza nakon žetve 2012. i tokom skladištenja 2013. godine bila veoma visoka u celoj zemlji. Najveće prisustvo AfB₁ i u pogledu koncentracija i u pogledu rasprostranjenosti je zabeleženo u vojvođanskoj regiji, međutim visoki intenzitet kontaminacije je utvrđen širom Republike Srbije. Takođe je zabeležen i trend rasta koncentracija AfB₁ tokom skladištenja usled pojave sekundarne kontaminacije. Dobijeni rezultati su uporedivi sa saopštenjima autora iz drugih zemalja gde je u različitim istraživanjima utvrđena kontaminacija kukuruza sa AfB₁ (Abbas i sar, 2006; Alptekin i sar, 2009; Williams, 1999; Karami-Osboo i sar, 2012).

6.2 Aflatoksin M₁ u mleku

Posledica visokog sadržaja AfB₁ u kukuruzu, koji predstavlja osnovnu sirovinu za proizvodnju hrane za životinje, jeste pojava njegovog metabolita, AfM₁ u mleku krava (EFSA, 2004). Dobijeni rezultati obimnog istraživanja prisustva AfM₁ u sirovom i termički obrađenom mleku (6.625 uzoraka uzorkovanih širom zemlje), nedvosmisleno ukazuju na značajan broj uzoraka sa utvrđenim sadržajem AfM₁ iznad MDK vrednosti.

U pregledu literature ove disertacije detaljno su predstavljene MDK vrednosti za AfM₁ koje se primenjuju u većini zemalja sveta. Od 2011. godine Republika Srbija je uskladila MDK vrednost za AfM₁ sa maksimalnom dozvoljenom količinom koja se primenjuje u EU (Sl. glasnik RS broj 28/11) i koja iznosi 0,05 µg/kg. Međutim, MDK vrednost za AfB₁ u hranivima i potpunim smešama za ishranu mlečnih krava, od čijeg poštovanja direktno zavisi koncentracija AfM₁ u mleku, nije usklađena sa evropskim propisima i ostala je na nivou od 50 µg/kg u hranivima, odnosno 10 µg/kg u potpunim smešama za ishranu mlečnih krava (Sl. glasnik RS broj 4/10) za razliku od propisa EU (2002/32/EC) koji propisuju MDK vrednost za AfB₁ od 20 µg/kg u hranivima i 5 µg/kg u potpunim smešama za ishranu mlečnih krava.

Ovakava neusaglašenost u MDK vrednostima između AfB₁ u hranivima i AfM₁ u mleku, uz pojavu intenzivne kontaminacije kukuruza 2012. godine AfB₁, neminovno je dovela do toga da veći deo proizvedenog mleka više nije zadovoljavao nacionalne propise u pogledu sadržaja AfM₁. Suočavajući se sa nastalom situacijom, Vlada Republike Srbije je suspendovala MDK vrednost za AfM₁ u mleku od 0,05 µg/kg i vratila prethodno važeću vrednost od 0,5 µg/kg (izmene Pravilnika o maksimalno dozvoljenim količinama sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja, Sl. glasnik RS broj 20/13, član 9a, prilog 5, tačka 2.1.13).

U trenutku pisanja ove diskusije (februar 2014. godine), MDK od 0,5 µg/kg AfM₁ u mleku je još uvek na snazi. Iz tog razloga, odlučili smo se da dobijene rezultate ispitivanja sadržaja AfB₁ u kukuruzu i AfM₁ u mleku tumačimo dvojako u odnosu na MDK vrednost, odnosno da predstavimo broj i procenat uzoraka koji prekoračuju, odnosno zadovoljavaju i nacionalni i evropski MDK.

6.2.1 Sadržaj aflatoksina po regijama

Od svih analiziranih uzoraka mleka tokom 2013. godine, utvrđeno je da nacionalnu MDK vrednost od 0,5 µg/kg prelazi 9,05% uzoraka uzetih sa područja beogradske regije, 2,55% uzoraka uzetih sa područja centralne Srbije i 7,09% uzoraka uzetih sa područja vojvođanske regije. Međutim, ukoliko dobijene rezultate tumačimo koristeći MDK vrednost koja se primenjuje u EU od 0,05 µg/kg, broj uzoraka koji ne ispunjavaju ovaj propis značajno raste i iznosi 67,30% u beogradskoj regiji, 58,16% u centralnoj Srbiji i čak 79,83% u vojvođanskoj regiji. Maksimalne izmerene vrednosti AfM₁ u mleku bile su 1,778 µg/kg, 1,475 µg/kg i 1,710 µg/kg, u beogradskoj, centralnoj Srbiji i Vojvođanskoj regiji. Srednje vrednosti koncentracije AfM₁ iznosile su 0,184 µg/kg, 0,117 µg/kg i 0,205 µg/kg u navedenim regijama.

Treba naglasiti da redosled regija po prisustvu rezidua AfM₁ u mleku u potpunosti odgovara redosledu intenziteta kontaminacije kukuruza AfB₁ (vojvođanske regija>beogradska regija>centralna Srbija).

Dobijene vrednosti ukazuju na veoma visok nivo rezidua AfM₁ u mleku ukoliko ih poredimo sa vrednostima koje su utvrdili autori iz zemalja severne i zapadne Evrope. Naime, prema izveštaju evropske Agencije za bezbednost hrane (EFSA, 2004), prevalencija AfM₁ u okviru zemalja članica EU je veoma niska. Od ukupno 11.831 analiziranih uzoraka mleka u periodu 1996-2001, udeo uzoraka sa prekoračenom MDK vrednošću od 0,05 µg/kg iznosio je samo 0,06%. Studija iz Velike Britanije (Food Standards Agency, 2001), nije utvrdila prisustvo AfM₁ u 100 ispitivanih uzoraka mleka. Nemačka je dostavila EFSA-i podatke o 6.537 uzoraka analiziranih 1999. godine i još 3.618 uzoraka analiziranih 2000. godine (EFSA, 2004). Ni u jednom uzorku mleka nije zabeleženo prisustvo AfM₁ iznad MDK koji važi u EU. Identične podatke su dostavila regulatorna tela Finske (296 uzoraka), Francuske (234 uzorka), Irske (62 uzorka), Holandije (30 uzoraka) i Švedske (11 uzoraka).

Treba naglasiti da ovi podaci nisu iznenađujući ukoliko se ima u vidu da sve navedene zemlje, zahvaljujući svom geografskom položaju, imaju umereno-kontinentalnu klimu i ne beleže pojavu ekstremno toplih i sušnih letnjih perioda. Sa druge strane, grčka studija (Tsakiris i sar, 2013) je objavila rezultate 196 analiziranih uzoraka mleka tokom 2009. i 2010. godine. Prisustvo AfM₁ je potvrđeno u čak 46,5% uzoraka, ali prekoračenje MDK vrednosti je zapaženo u samo dva uzorka. Treba imati u vidu i činjenicu da u navedenim godinama nisu zabeležene ekstremne suše.

Prethodno izneti podaci jasno ukazuju na presudan značaj klimatskih faktora na pojavu AfB₁ u žitaricama i posledičnu pojavu AfM₁ u mleku. Zemlje sa umereno kontinentalnom klimom u dužem vremenskom periodu ne beleže

prisustvo AfM₁ u mleku, dok u zemljama sa mediteranskom klimom prisustvo rezidua AfM₁ predstavlja objektivni problem sa kojim se ove zemlje suočavaju.

Ukoliko naša zapažanja poredimo sa studijama Turskih autora, dolazimo do podataka pogodnijih za poređenje sa našim rezultatima. Studija izvedena na 129 uzoraka mleka (UHT) iz centralne Anatolije (Unusan, 2006), je utvrdila prekoračenje MDK vrednosti od 0,05 µg/kg u 47% ispitanih uzoraka. Srednja vrednost koncentracije AfM₁ iznosila je 0,108 µg/kg a najviša vrednost je prelazila 0,5 µg/kg. Marnissi i sar. (2012) u Maroku su utvrdili niže koncentracije AfM₁ u mleku, u odnosu na naša zapažanja. U studiji koja je obuhvatala ispitivanje 48 uzoraka mleka, prijavljeno je 27% pozitivnih uzoraka na prisustvo AfM₁, dok je MDK vrednost od 0,05 µg/kg prekoračena u samo 4 uzorka. Sa druge strane, Ghanem i Orfi (2009) u Siriji prijavljuju izuzetno visok broj uzoraka mleka sa sadržajem AfM₁ (80% od 126 ispitanih uzoraka) sa izmerenim koncentracijama u rasponu od 0,02 µg/kg do 0,765 µg/kg. Najveći broj uzoraka mleka sa sadržajem AfM₁ je utvrđen u studiji iz Irana (Nemati i sar, 2010). Od 90 analiziranih uzoraka, svi su pokazali sadržaj AfM₁, a u 33% uzoraka je izmerena koncentracija AfM₁ prelazila 0,05 µg/kg.

U 2013 godinije obavljena prva značajnija studija u Srbiji o kontaminaciji mleka sa AfM₁ (Kos i sar, 2013). Uzorkovano je 176 uzoraka mleka goveda, koza i magarica, kao i mleka žena. Od uzetih uzoraka kravljeg mleka (150), u čak 98,7 % je utvrđeno prisustvo AfM₁ a u 86 % uzoraka je prekoračena MDK vrednost koja je propisana u EU od 0,05 µg/kg. Iako ovi rezultati prikazuju nešto viši obim prisustva rezidua AfM₁ u procentima u odnosu na naše vrednosti, ove razlike nisu velike i mogu se objasniti razlikom u broju analiziranih uzoraka, te se može zaključiti da i drugi autori u Republici Srbiji beleže veoma visok broj uzoraka mleka koji sadrže rezidue AfM₁.

Na osnovu iznetih rezultata i poređenja sa literaturnim podacima, može se zaključiti da je sadržaj AfM₁ u uzorcima mleka analiziranih tokom 2013. godine u

Republici Srbiji bio izuzetno visok, kako po osnovu broja uzoraka za koje je utvrđeno da sadrže AfM₁, tako i po osnovu izmerenih koncentracija ovog metabolita.

Poređenje sa zemljama u kojima vladaju klimatske prilike slične onima koje su vladale u našoj zemlji u 2012. godini, (Grčka, Turska, Maroko, Iran, Sirija) ukazuju na sličan procenat uzoraka koji sadrže AfM₁. Međutim, u odnosu na izmerene koncentracije, može se zaključiti da je koncentracija AfM₁ u mleku bila najviša u Republici Srbiji, bez obzira da li se radi o srednjim ili maksimalnim vrednostima sadržaja AfM₁ u mleku.

Ovakvi rezultati se donekle mogu objasniti izuzetno jakom sušom koja dugi niz decenija nije zabeležena na teritoriji Republike Srbije, čija je poljoprivredna proizvodnja objektivno neprilagođena ovakvim ekstremnim vremenskim prilikama. Međutim, evidentno je da je neophodno sprovesti niz preventivnih mera u cilju sprečavanja ponavljanja ovakvog scenarija.

6.2.2 Distribucija aflatoksina M₁ kroz regije

Analizom rezultata koji se odnose na distribuciju AfM₁ u okviru tri regije, uvidom u histograme (grafikoni 18, 19 i 20) koji prikazuju raspodelu koncentracija, može se utvrditi visoki stepen pravilnosti. Raspodela koncentracija od najnižih do najviših izmerenih vrednosti ima oblik gotovo idealne Gausove krive. Ovakvi rezultati govore o činjenici da je za razliku od distribucije AfB₁ u kukuruzu, uniformnost prisustva AfM₁ u uzorcima mleka daleko veća zbog prirode matriksa. Ukoliko eliminišemo uzorke za koje je utvrđeno da ne sadrže AfM₁, najveći broj pozitivnih uzoraka u sve tri regije je koncentrisan između logaritamskih vrednosti koncentracija od 1,5 do 2,5 u beogradskoj regiji i centralnoj Srbiji. Ovo odgovara apsolutnim vrednostima koncentracija od 0,032

$\mu\text{g}/\text{kg}$ do $0,316 \mu\text{g}/\text{kg}$. Izuzetak čini vojvođanska regija, gde je zabeleženo najveće prisustvo AfM₁ i gde se najveći broj pozitivnih uzoraka nalazi u intervalu od 2 do 2,6 (od $0,100 \mu\text{g}/\text{kg}$ do $0,398 \mu\text{g}/\text{kg}$).

Analiza varijanse statističke serije rezultata za AfM₁ u mleku ukazuje na značajne razlike u koncentracijama između pojedinih regija. Studentov t-test pokazuje veoma niske „p” vrednosti u poređenju razlika između svih regija ($p < 0,0001$). Ovo na prvi pogled može izgledati neusklađeno sa rezultatima dobijenim za AfB₁ u kukuruzu gde su ove razlike manje. Međutim, treba imati u vidu da su male razlike u sadržaju AfB₁ u kukuruzu posledica činjenice da su ekstremne vremenske prilike u leto 2012. godine pogodile celu zemlju. Sa druge strane, statistički značajne razlike u sadržaju AfM₁ u mleku po regijama se mogu objasniti neravnomernom raspodelom farmi mlečnih krava kao i objekata za otkup i preradu mleka. Koncentracija ovih privrednih subjekata je daleko veća na teritoriji vojvođanske i beogradske regije u odnosu na centralnu Srbiju, a samim tim i proizvodnja i prerada mleka.

Iako navedene razlike pokazuju statističku značajnost, treba naglasiti da je u sve tri regije zabeležen visok procenat uzoraka mleka koji prelaze MDK za AfM₁ propisan u EU, a da su najviše koncentracije AfM₁ izmerene u vojvođanskoj i beogradskoj regiji. Ovakvi rezultati pre govore o većoj razvijenosti poljoprivredne i stočarske proizvodnje na ovim područjima u odnosu na centralnu Srbiju nego o eventualnim objektivnim razlikama u stepenu zastupljenosti rezidua AfM₁ usled drugih faktora.

6.2.3 Promena sadržaja aflatoksina M₁ tokom vremena

Osnovni cilj analize sadržaja AfM₁ u mleku tokom tri vremenska perioda bio je da se utvrdi trend promene koncentracija tokom vremena u odnosu na rezultate dobijene za AfB₁ u kukuruzu. Može se zaključiti da je prethodno ustanovljeni trend

rasta koncentracija AfB₁ u kukuruzu usled sekundarne kontaminacije, adekvatno praćen rastom sadržaja AfM₁ u uzorcima mleka uzetim u sve tri regije. Ovakvi rezultati potvrđuju ispravnost donetih zaključaka u odnosu na kontaminaciju kukuruza AfB₁. Ipak, treba naglasiti da za razliku od linija trenda za AfB₁ koje ukazuju na intenzivan rast kontaminacije tokom dva perioda uzorkovanja, analiziranjem trenda rasta sadržaja AfM₁ u mleku, dolazi se do zaključka da proces rasta nije toliko intenzivan. Linija trenda koja opisuje promene u sadržaju AfM₁ u vojvođanskoj regiji pokazuje najmanji rast u tri perioda ispitivanja, ali sa druge strane vojvođanska regija beleži i najviše prosečne i maksimalne koncentracije AfM₁ u uzorcima mleka (grafikon 24).

Ovakva pojava se može objasniti na dva načina. Sa jedne strane, najviše srednje vrednosti koncentracija AfM₁ u vojvođanskoj regiji uz veoma slab rast kroz periode može da se objasni faktičkim dostizanjem maksimuma koncentracija AfM₁ u odnosu na stepen kontaminacije kukuruza sa AfB₁. Sa druge strane, blaži rast koncentracija AfM₁ u mleku u odnosu na AfB₁ u kukuruzu može da se posmatra i kroz niz mera koje su od pojave toksina preduzimate od strane regulatornih tela i subjekata u lancu proizvodnje i prerade stočne hrane i mleka u cilju smanjenja prisustva rezidua AfM₁ u mleku (izbacivanje visoko kontaminiranog kukuruza iz ishrane životinja, preusmeravanje srednje kontaminiranog kukuruza u ishranu svinja i živine, smanjenje udela kukuruzne komponente u ishrani mlečnih krava, upotreba adsorbenata u cilju smanjenja resorpcije AfB₁).

Međutim, i uz sve preduzete mere, intenzitet i obim prisustva AfM₁ u mleku u toku trajanja aflatoksinske krize u Republici Srbiji bio je konstantno visok. Zato se može zaključiti da je jedini način da se prisustvo AfM₁ u mleku spreči ili svede na manju meru, sprovođenje mera u cilju sprečavanja kontaminacije kukuruza sa AfB₁, kako primarne, tako i sekundarne, kao i da se uspostavi sistem permanentne kontrole hrane za životinje na prisustvo mikotoksina. Da se zakonska regulativa za prisustvo AfB₁ u kukuruzu i smešama za ishranu mlečnih krava izjdnaci sa EU regulativom te će automatski biti smanjeno i prisustvo rezidua AfM₁ u mleku.

6.3 Validacija UPLC-MS/MS metoda za određivanje aflatoksina B₁ u kukuružu i aflatoksina M₁ u mleku i poređenje sa ELISA metodama

Na osnovu svih podataka predstavljenih u ovoj disertaciji, a koji se odnose na kontaminaciju kukuruza AfB₁ i prisustvo rezidua AfM₁ u mleku, jasno se može sagledati veliki značaj koji analitička metodologija ima u cilju prevencije i saniranja pojave ovih jedinjenja u lancu hrane ljudi i životinja. Realan uvid u obim i intenzitet kontaminacije kukuruza AfB₁ i prisustva rezidua AfM₁ u mleku, nije moguć bez pouzdanih metoda koje omogućuju tačno i precizno utvrđivanje koncentracije toksina u hrani i hrani za životinje. Imajući u vidu i činjenicu da su MDK vrednosti za AfB₁ i AfM₁ regulisane zakonima u gotovo svim zemljama sveta (FAO, 2004), značaj implementacije adekvatne analitičke metodologije postaje još jasniji.

Evropska unija je kodifikovala zahteve za analitičke metode i oni se nalaze u dva dokumenta. Opšti zahtevi i procedura validacije za analitičke metode dati su u Direktivi Saveta 2002/657/EC, dok su specifični kriterijumi koje treba da ispune analitičke metode za određivanje mikotoksina dati u „Pravilniku Komisije EC 401/2006”. Imajući u vidu činjenicu da zakonski okvir Republike Srbije za sada nema analogne propise koji se odnose na zahteve i kriterijume za analitičke metode, navedeni dokumenti su nam poslužili kao osnova za evaluaciju performansi UPLC-MS/MS metoda za određivanje AfB₁ u kukuružu i AfM₁ u mleku.

Pored zvaničnih kriterijuma, metode koje se koriste za određivanje AfB₁ i AfM₁ treba da omogućavaju i veliku propusnu moć, odnosno veliku brzinu izvođenja analize, naročito u slučajevima masovnih pojava AfB₁ i AfM₁ kao što je to zabeleženo u Republici Srbiji u 2012. i 2013. godini. Poželjno je takođe da ove metode ne budu previše skupe za izvođenje, a sa druge strane da omoguće nedvosmislenu identifikaciju i tačnu kvantifikaciju traženih jedinjenja i to potvrđivanjem (konfirmacijom) njihove hemijske strukture.

Jasno je da jedna metoda, odnosno jedna analitička tehnika ne može da ispuni sve ove uslove. Tehnike zasnovane na masenoj spektrometriji (UPLC-MS/MS) su u stanju da pruže uvid u strukturu jedinjenja od interesa na osnovu njegove mase i mase njegovih fragmenata nakon cepanja molekulskog jona pod strogo kontrolisanim uslovima. Međutim, ove tehnike zahtevaju veoma skupu instrumentaciju i visoko obučeni kadar, kao i pristup standardnom materijalu i hemikalijama visoke čistoće što u velikoj meri utiče na cenu analize. Sa druge strane, tehnike zasnovane na imunoenzimskim reakcijama (ELISA) se izvode sa prefabrikovanim mikrotitar pločama (kit) i unapred pripremljenim standardnim materijalom a zahtevaju osnovnu laboratorijsku opremu za izvođenje. Čak i ukoliko laboratorija nije opremljena čitačem apsorbanci, vizuelna identifikacija boje omogućava kvalitativno utvrđivanje AfB₁ i AfM₁. Za analizu 96 uzoraka (jedna mikrotitar ploča) potrebno je oko 60 minuta, ukoliko su uzorci kukuruza samleveni a uzorci mleka obezmašćeni. Tehnike zasnovane na masenoj spektrometriji nisu u stanju da omoguće ovakvu brzinu izvođenja analize, iako je postignut značajan napredak u poslednjoj deceniji i na ovom polju, pa prelazak sa klasičnih HPLC kolona i uređaja, na UPLC hromatografsku tehniku znatno skraćuje vreme analize po uzorku (Beltran i sar, 2009; Spanjer i sar, 2008).

Iz ovih razloga, naš pristup analitičkoj metodologiji pri izvođenju eksperimentalnog dela ove disertacije je bio dvojak. Imajući u vidu da je ukupno analizirano 7.305 uzoraka kukuruza i mleka, ELISA metode za AfB₁ i AfM₁ su bile tehnike izbora za određivanje koncentracije ovih jedinjenja. Jedna od ograničavajućih faktora kod ELISA metoda je mogućnost pojave lažno pozitivnih rezultata (Stroka i Anklam, 2002). Ukoliko postoji sumnja na lažno prisustvo AfB₁ ili AfM₁, ono se može potvrditi ili osporiti analiziranjem uzoraka potvrđujućim (konfirmatornim) tehnikama kakva je UPLC-MS/MS. Međutim, ovakav pristup ima smisla ukoliko se radi o sporadičnom nalazu AfB₁ ili AfM₁ kod redovnih kontrola kukuruza i mleka. U slučaju masovne kontaminacije kukuruza AfB₁ i posledičnog prisustva AfM₁ u mleku, kao što je to zabeleženo u našoj zemlji, nakon izvođenja

inicijalnih konfirmatornih analiza, potpuno je jasno da se radi o ovim jedinjenjima, te se pristupa izvođenju brzih metoda u cilju što efikasnije procene obima i intenziteta kontaminacije. U slučajevima visokog broja kontaminiranih uzoraka, ovakav pristup je jedino racionalno rešenje. Uvidom u dostupnu naučnu literaturu, utvrđeno je da je većina autora studija o kontaminaciji kukuruza AfB₁ i prisustvu rezidua AfM₁ u mleku koristila ELISA metodu za merenje koncentracija ovih jedinjenja (Decastelli i sar, 2005; Pietri i sar, 2004; Giray i sar, 2009; Oruc i sar, 2007; Rodriguez i sar, 2003; Roussi i sar, 2002 i drugi).

Iz ovih razloga smo odlučili da ELISA tehnikom izvršimo merenje sadržaja AfB₁ u uzorcima kukuruza i AfM₁ u uzorcima mleka. Uz ova merenja, paralelno je sprovedena UPLC-MS/MS analiza nad 100 identičnih uzoraka kukuruza i 250 uzoraka mleka, sa ciljem da se najpre potvrdi prisustvo AfB₁ u kukuruzu i AfM₁ u mleku, a zatim i da se izvrši poređenje rezultata dobijenih korišćenjem dve analitičke tehnike, i utvrdi stepen njihovog slaganja.

6.3.1 Validacija UPLC-MS/MS metoda za određivanje sadržaja aflatoksina B₁ u kukuruzu i aflatoksina M₁ u mleku

Deo poglavlja u pregledu literature ove disertacije, odnosio se i na predstavljanje različitih analitičkih pristupa pri razvoju UPLC-MS/MS analitičkih metoda za određivanje sadržaja AfB₁ u kukuruzu i AfM₁ u mleku. Zahvaljujući visokoj selektivnosti i specifičnosti masenih spektrometara, potreba za ekstenzivnim prečišćavanjem uzoraka se smanjuje. Analitičke tehnike zasnovane na tačnoj hromatografiji sa fluorescentnom detekcijom zahtevaju nekoliko koraka prečišćavanja uzoraka kukuruza i mleka u cilju eliminacije interferenci, odnosno omogućavanja detektovanja signala koji je posledica prisustva AFB₁ ili AfM₁, umesto nekog drugog jedinjenja koje pokazuje sposobnost fluorescencije a koje bi potisnulo signal koji je od interesa. Ovakav scenario dovodi do pojave ili lažno pozitivnih rezultata, ukoliko se retenciono vreme elucije tog jedinjenja poklapa sa

retencionim vremenom AfB₁, odnosno AfM₁, ili do pojave lažno negativnih rezultata, ukoliko se retenciono vreme interferirajućeg signala nalazi blizu vremena elucije AfB₁ ili AfM₁, ali je njegov intenzitet veći te dolazi do maskiranja prisutnih signala koji vode poreklo od mikotoksina.

Da bi se ovo izbeglo, neophodno je prečišćavanje uzoraka i to najčešće korišćenjem imunoafinitetnih kolona (Beltran i sar, 2011). Ovakav pristup daje veoma dobre rezultate (Jaimez i sar, 2000; Sizoo i van Egmond, 2005), ali znatno produžava vreme izvođenja analize i povećava njenu cenu.

Sa druge strane, zahvaljujući principu rada masenog spektrometra u MRM načinu merenja, prisustvo interferenci je svedeno na minimum čime se omogućava manje striktni pristup u procedurama prečišćavanja, uključujući i mogućnost analize sirovih ekstrakta kukuruza i mleka. Ovaj pristup omogućava značajne uštede u materijalu i vremenu izvođenja analize. Studije brojnih autora prijavljuju validne rezultate merenja sadržaja AfB₁ i AfM₁ korišćenjem ovakvog pristupa (Bertran i sar, 2009; Demulle i sar, 2006; Frenich i sar, 2009; Herebian i sar, 2009; Spanjer i sar, 2008; Sulyok i sar, 2006; Sulyok i sar, 2009). Dobijeni rezultati naših ispitivanja potvrđuju ove navode, te se može zaključiti da je ovakva metodologija u stanju da ispuni zahteve koji se postavljaju pred analitičke metode.

Analiziranjem rezultata validacionog procesa za UPLC-MS/MS metode za određivanje AfB₁ u kukuruzu i AfM₁ u mleku, može se zaključiti da obe metode ispunjavaju uslove propisane u relevantnim dokumentima EU koji određuju kriterijume koje analitičke metode moraju da ispune da bi mogle da se koriste u svrhe službenih kontrola (Direktivi Saveta 2002/657/EC, Pravilniku Komisije EC 401/2006). Visoki koeficijenti linearnosti ($r^2=0,997$ za AfB₁ i $r^2=0,990$ za AfM₁) dobijeni analiziranjem slepih proba kukuruza i mleka obogaćenih standardima AfB₁ i AfM₁, obezbeđuju visoki stepen tačnosti pri kvantifikaciji sadržaja AfB₁ i AfM₁ u kukuruzu i mleku. Prinos metode za AfB₁ (81,2% - 93,5%), i metode za AfM₁ (75,3% - 89,2%) zadovoljavaju zahteve u pogledu minimalnih vrednosti

prinosa za AfB₁ i AfM₁ na nivoima MDK od 20 µg/kg i 0,05 µg/kg. Koeficijenti varijacije, odnosno relativna standardna devijacija u uslovima reproducibilnosti, ukazuje kod obe metode na prihvatljivi nivo varijacija rezultata višestrukih ponavljanja obogaćenih uzoraka kukuruza i mleka AfB₁ i AfM₁ na MDK vrednostima. Prosečan koeficijent varijacije UPLC-MS/MS metode za određivanje AfB₁ u kukuruzu iznosi 7,7% na 20 µg/kg, dok kod UPLC-MS/MS metode za određivanje AfB₁ u kukuruzu koeficijent varijacije na 0,05 µg/kg iznosi 9,9%. Dobijene vrednosti odgovaraju zahtevima postavljenim u dokumentima koji se odnose na kriterijume za performanse analitičkih metoda imajući u vidu propisane MDK vrednosti.

Na osnovu dobijenih rezultata možemo da zaključimo da UPLC-MS/MS metoda za određivanje AfB₁ u kukuruzu i UPLC-MS/MS metoda za određivanje AfM₁ u mleku mogu da se koriste u svrhe kako naučnih istraživanja tako i u svrhe službenih kontrola, i da obezbeđuju visoki stepen pouzdanosti dobijenih rezultata.

6.3.2 Poređenje ELISA i UPLC-MS/MS metoda za određivanje AfB₁ i AfM₁

Iz prikazanih rezultata regresione analize 100 vrednosti koncentracija AfB₁ u kukuruzu i 250 vrednosti koncentracija AfM₁ u mleku, može se izvesti zaključak o visokom stepenu saglasnosti dobijenih rezultata korišćenjem dve tehnike. Ovo je slučaj kako kod poređenja metoda za AfB₁, tako i u slučaju AfM₁.

Uvidom u dobijene koeficijente korelacije ($r^2=0,994$ za AfB₁ i $r^2=0,9201$ za AfM₁), uočava se viši stepen slaganja dve analitičke tehnike za određivanje AfB₁ u odnosu na AfM₁. Objašnjenje za ovakvu pojavu treba tražiti u MDK vrednostima koje su 400 puta više za AfB₁ u odnosu na AfM₁ (20 µg/kg u odnosu na 0,05 µg/kg) i posledično veću stabilnost i koherentnost dobijenih vrednosti. Takođe, uvidom u regresionu krivu koja opisuje stepen slaganja ELISA i UPLC-MS/MS metode za AfM₁ u mleku, uočava se trend većeg rasipanja viših vrednosti u odnosu na niže.

Objašnjenje za ovu pojavu leži u manjem opsegu linearnosti ELISA metode i njenoj tendenciji da se brže dostigne plato apsorbance pri merenju. Maksimalna vrednost koncentracije AfM₁ koja se može detektovati u uzorcima mleka ELISA metodom je 0,250 µg/kg. Ukoliko se nađu više koncentracije, potrebno je ponoviti analizu uz razblaživanje uzorka da bi se došlo do tačnih vrednosti.

Ukoliko se sve navedeno uzme u obzir, može se zaključiti da ELISA i UPLC-MS/MS, analitičke tehnike za određivanje sadržaja AfB₁ u kukuruzu i AfM₁ u mleku pokazuju visoki stepen saglasnosti, i da je moguće koristiti obe tehnike u rutinskoj praksi za merenje sadržaja AfB₁ i AfM₁.

7. ZAKLJUČCI

1. Ukupno je ispitano 680 uzoraka kukuruza u tri regije Republike Srbije. Srednje vrednosti koncentracija AfB₁ iznosile su 28,06 µg/kg, 29,1 µg/kg i 33,21 µg/kg u beogradskoj regiji, centralnoj Srbiji i vojvođanskoj regiji. Maksimalne zabeležene vrednosti AfB₁ bile su 560 µg/kg, 475 µg/kg i 215 µg/kg u navedenim regijama.

2. Rezultati u pogledu kretanja sadržaja AfB₁ u uzorcima kukuruza, tokom dva perioda ispitivanja, ukazuju na trend rasta koncentracije AfB₁ u kukuruзу u sve tri regije zasebno, kao i na nivou cele Republike Srbije. Najintenzivniji rast sadržaja AfB₁ zabeležen je u uzorcima kukuruza sa područja vojvođanske regije, zatim centralne Srbije, dok je linija trenda najblaža u uzorcima kukuruza poreklom iz beogradske regije.

3. Utvrđeno je da 22,49%, 29,73% i 20,77% ispitivanih uzoraka iz beogradske regije, centralne Srbije i vojvođanske regije, nije bilo usaglašeno sa nacionalnom MDK vrednošću za AfB₁ u kukuruзу. Ukoliko bi se primenila MDK vrednost koja se primenjuje u EU, procenat neusaglašenih uzoraka iz navedenih regija je 30,76%, 44,93% i 37,66% uzoraka kukuruza.

4. Srednje vrednosti koncentracija AfM₁ u 6.625 uzoraka mleka u tri regije Republike Srbije iznosile su 0,184 µg/kg, 0,117 µg/kg i 0,205 µg/kg u beogradskoj regiji, centralnoj Srbiji i Vojvođanskoj regiji. Maksimalne izmerene vrednosti AfM₁ u mleku bile su 1,778 µg/kg, 1,475 µg/kg i 1,710 µg/kg u navedenim regijama.

5. Rezultati u pogledu kretanja sadržaja AfM₁ u mleku tokom tri vremenska perioda ispitivanja, ukazuju na postojanje trenda rasta u sve tri regije zasebno, kao i na nivou cele Republike Srbije. Linija trenda koja opisuje promene u sadržaju AfM₁ tokom vremena pokazuje najviši intenzitet rasta u beogradskoj regiji, zatim u centralnoj Srbiju, dok je najniži intenzitet rasta zabeležen u vojvođanskoj regiji.

6. Utvrđeno je da 2,55%, 7,09% i 9,05% ispitivanih uzoraka iz beogradske regije, centralne Srbije i vojvođanske regije, nije bilo usaglašeno sa nacionalnom MDK vrednošću za AfM₁ u mleku, dok 58,16%, 79,83% i 67,30% uzoraka iz navedenih regija nije bilo usaglašeno sa MDK vrednošću koja se primenjuje u EU.

7. Na osnovu dobijenih rezultata iz procesa validacije, zaključuje se da UPLC-MS/MS metoda za određivanje AfB₁ u kukuruzu i UPLC-MS/MS metoda za određivanje AfM₁ u mleku mogu da se koriste u svrhe kako naučnih istraživanja tako i u svrhe službenih kontrola, i da obezbeđuju visoki stepen pouzdanosti dobijenih rezultata merenja.

8. Poređenjem ELISA i UPLC-MS/MS metoda za određivanje sadržaja AfB₁ u kukuruzu i AfM₁ u mleku, ustanovljen je visok stepen saglasnosti dobijenih rezultata. ELISA predstavlja trijažnu analitičku tehniku pogodnu za analiziranje velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom periodu, dok se UPLC-MS/MS tehnikom nedvosmisleno utvrđuje prisustvo AfB₁ i AfM₁ na osnovu njihove hemijske strukture.

9. U cilju sprečavanja ulaska AfB₁ u lanac ishrane životinja i posledične pojave njegovog metabolita AFM₁ u mleku, neophodno je uskladiti postojeću zakonsku regulativu u pogledu MDK vrednosti za AfB₁ u hrani za životinje i AfM₁ u mleku sa važećim propisima u EU.

10. Takođe je potrebno da se na nacionalnom nivou definiše i implementira program sistematskog praćenja mikotoksina u hrani za životinje (monitoring program), zbog pravovremenog otkrivanja njihovog prisustva i preduzimanja adekvatnih mera.

8. LITERATURA

AA.VV., (Various Authors), 2005. *Distribution of mycotoxins in Italian maize production*. Informatore Agrario, 61, 47-51.

Abbas H.K., Weaver M.A., Zablutowicz R.M., Horn B.W. and Shier W.T., 2005. *Relationships between aflatoxin production and sclerotia formation among isolates of Aspergillus section Flavi from the Mississippi Delta*. European Journal of Plant Pathology, 112, 283-287.

Abbas H.K., Zablutowicz R.M., Bruns H.A., Abel C.A., 2006. *Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic Aspergillus flavus isolates*. Biocontrol Sci Technol. 16(5):437-449.

Alperden I., Aran N., Topal S., Eke D., Kara M. and Karaali A., 1990. *Systematic analysis of mycoflora Turkish foodstuffs*. NATO-TU Mycotoxins Project. Joint-Final Report of Mycology and System Analysis Subprojects. Gebze-Kocaeli, Turkey.

Alptekin Y., Duman A.D. and Akkaya M.R., 2009. *Identification of fungal genus and detection of aflatoxin level in second crop corn grain*. Journal of Animal and Veterinary Advances, 8, 1777- 1779.

Asao, T., Buchi,G., Abdel-Kader, M.M., Chang,S.B., Wickand, E.L., Wogan, G.N., 1963. *Aflatoxins B and G* J.Am.Chem.Soc.85,1706.

- Battilani P., Barbano C. and Piva G., 2008. *Aflatoxin B1 contamination in maize related to the aridity index in North Italy*. World Mycotoxin Journal, 1, 449-456.
- Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J. V., & Hernández, F., 2009. *Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 23(12), 1801-1809.
- Berry, C.L., 1998. *The pathology of mycotoxin*. J. Pathol., 154: 301-311.
- Bhat R.V., Krishnamachari K.A.V.R., 1977. *Follow-up study of aflatoxic hepatitis in parts of western India*. Indian J Med Res 66:55-8.
- Bhatnagar D., Cary J.W., Ehrlich K.C., Yu J., Cleveland T.E., 2006. *Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and Aspergillus flavus development*. Mycopathologia 162:155-166.
- Bhatnagar D., Ehrlich K.C., Yu J., Cleveland T.E., 2003. *Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis*. Appl Microbiol Biotechnol. 61:83-93.
- Bilandzic, N., Varenina, I., Solomun, B., 2010. *Aflatoxin M1 in raw milk in Croatia*. Food Control, (21), 1279-1281.
- Blüthgen, A., and Ubben, E.H., 2000. *Survey of the contamination of feeds and tank bulk milk with aflatoxins B1 and M1*. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte. 52, 335-354.
- Bočarov-Stančić, A., Milovac, M., Gološin, B. 2000. *Nalaz mikotoksina u žitaricama I stočnoj hrani*. Savetovanje ITNMS, Beograd
- Boutrif, E. & Canet, C., 1998. *Mycotoxin prevention and control: FAO programmes*. Revue de Médecine Vétérinaire 149: 681-694.

Braicu C., Puia C., Bodoki E. and Socaciu C., 2008. *Screening and quantification of aflatoxins and ochratoxin A in different cereals cultivated in Romania using thin-layer chromatography- densitometry*. Journal of Food Quality, 31, 108-120.

Bryden W.L., 2012. *Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security*. Anim Feed SciTech. 173: 134-158.

Butler, W.H., 1974: *Aflatoxin*. In: I.F.H.Purchase (Ed.) Mycotoxins. Elsevier Scientific publ. Co., Amsterdam, the Netherlands.

Carnaghan, R. B. A., Hartley R. D. and J. O'Kelly. 1963. *Toxicity and Fluorescence Properties of the Aflatoxins*. Nature, 200(4911), 1101-1101.

Cary, J. W. and Ehrlich K. C. 2006. *Aflatoxigenicity in Aspergillus: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications*. Mycopathologia 162(3): 167-77.

Chang P. K. 2003. *The Aspergillus parasiticus protein AFLJ interacts with the aflatoxin pathway-specific regulator AFLR*. Mol. Genet. Genomics 268: 711-719.

Cinti F., Bortolotti M. and Casagrandi M., 2005. *Relationship between the aflatoxin content of maize grain and the feeds that contain it*. In: 1st National conference. Mycotoxins in agri-food chain. Istituto Superiore di Sanità. Rome, 29-30 November 2004. M Miraglia, C Brera. Rapporti ISTISAN 05/42 - Istituto Superiore di Sanità, 209-210.

Codex Alimentarius Commission. 2000. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. *Report of the 32nd session of the Codex Committee of Food Additives and Contaminants* Beijing, China, 20-24 March 2000. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.

Codex Alimentarius., 2012. *Maximum level for aflatoxin m1 in milk*. Alinorm 01/12a appendix x.

COMMISSION DECISION No 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.

COMMISSION REGULATION (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs (2006) OJ L 70/12

COMMISSION REGULATION (EU) No 178/2010 of 2 March 2010 amending Regulation (EC) No 401/2006 as regards groundnuts (peanuts), other oilseeds, tree nuts, apricot kernels, liquorice and vegetable oil (2010). L52/32

Costa A.K., Freire F.C., Vieira I.G.P., Andrade J.A. and Mendes F.N.P., 2009. *Fungi associated with Brazil nut and groundnut kernels sold in Fortaleza city (Brazil)*. Revista Ciencia Agronomica, 40, 455-460.

Cotty P.J. and Jaime-Garcia R., 2007. *Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination*. International Journal of Food Microbiology, 119, 109-115.

Coulter J.B.S., Hendrickse R.G., Lamplugh S.M., Macfarlane S.B.J., Moody J.B., Omer M.I.A., Suliman G.I., Williams T.E. 1986. *Aflatoxins and kwashiorkor: clinical studies in Sudanese children*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 80(6): 945-951.

COMMISSION REGULATION (EC) No 2003/2174/EC of 12 december 2003 amending Regulation 466/2001/EC as regards aflatoxins. Off. J. Eur. Commun. 2003;326:12.

COUNCIL DIRECTIVE 2002/32/EC of the european parliament and of the council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed OJ L 140 p10

COUNCIL DIRECTIVE No. 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products OJ L 125

Curtui V., Usleber E., Dietrich R., Lepschy J. and Martlbauer E., 1998. *A survey on the occurrence of mycotoxins in wheat and maize from western Romania*. Mycopathologia, 143, 97-103.

D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., 1997. *Mycotoxins*. Anim. Feed Sci. Technol. 69, 155-166.

Decastelli L., Lai J., Gramaglia M., Monaco A., Nachtmann C., Oldano F., Ruffier M., Sezian A. and Bandirola C., 2005. *Aflatoxin emergency in feedstuffs and in milk: 2004 Valle d'Aosta state*. Tecnica Molitoria, 56, 701-707.

Degen, G.H., Neumann, H.G., 1981. *Differences in aflatoxin B1-susceptibility of rat and mouse are correlated with the capability in vitro to inactivate aflatoxin B1-epoxide*. Carcinogenesis 2:299-306.

Degen G. H., Neumann H., 1978. *The major metabolite of aflatoxin B1 in the rat is a glutathione conjugate*. Chemico-biological Interactions, vol. 22, no. 2-3, pp. 239-255,.

Delmulle, B., De Saeger, S., Adams, A., De Kimpe, N., & Van Peteghem, C. 2006. *Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 16 mycotoxins on cellulose filters and in fungal cultures*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 20(5), 771-776.

Di Mavungu, J. D., Monbaliu, S., Scippo, M.-L., Maghuin-Rogister, G., Schneider, Y.-J., Larondelle, Y., et al. 2009. *LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements*. Food Additives and Contaminants – Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 26(6), 885–895.

Diener U.L., Cole R.J., Sanders T.H., Payne G.A., Lee L.S. and Klich M.A., 1987. *Epidemiology of aflatoxin formation by Aspergillus flavus*. Annual Review of Phytopathology, 25, 249-270.

Dowd P.F., Johnson E.T. and Williams W.P., 2005. *Strategies for insect management targeted toward mycotoxin management*. In: Aflatoxin and food safety. HK Abbas. Taylor & Francis Group, Boca Raton, London and New York, 517-541.

EFSA, 2012. *Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change*, [e-book], dostupno na <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/223e.pdf>

EFSA, *Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed* doi:10.2903/j.efsa.2004.39

El Marnissi B., Belkhou R., Morgavi D.P., Bennani L., Boudra H., 2012. *Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk collected from traditional dairies in Morocco*. Food Chem Toxicol. 22, 41-46

El-Sayed, A.M., Abd-Alla. A.S.E., Neamet-Allah, A.A. 2002. *Aflatoxins in human specimen collected in Egypt*. Mycotoxin Research 18, 23-30.

EURACHEM 1995. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. Laboratory of the Government Chemist, London 1995.

FAO, 2004. *Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*. Rome, FAO

FAO. 1996. *Basic facts on the world cereal situation*. Food Outlook, 5/6. Rome.

Fink-Gremmels J. 2008. *Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review*. Food Addit Contam 25:172–80.

Fink-Gremmels, J., 2005. *Mycotoxins in forages*. In: Diaz, D.E. (Ed.), *The Mycotoxin Blue Book*. Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom, pp. 249–268.

Food Standards Agency, UK, 2001, Survey of milk for mycotoxins (Number 17/01) – Food Survey Information Sheet.

Frenich, A. G., Vidal, J. L. M., Romero-González, R., & Aguilera-Luiz, M. d. M. 2009. *Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Food Chemistry, 117(4), 705–712.

Frisvald, J.C., Skoube, P. & Samson, R.A. 2005. *Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, Aspergillus rambellii sp. nov.* Systematic and Applied Microbiology, Vol. 28, pp 442-453

Fu, Z., Huang, X., & Min, S. 2008. *Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts*. Journal of Chromatography A, 1209(1–2), 271–274.

Galvano, F., Galofaro, V., Ritieni, R., 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 Additives and Contaminants, 7, 644-646.

Ghanem, I., and Orfi, M., 2009. *Aflatoxin M1 in raw, pasteurized and powdered milk available in the Syrian market*. Food Control, 20 (6): 603-605.

Gilbert, J. 1991. *Regulatory aspects of mycotoxins in the European Community and the USA*. In Champ, B.R, Highley, E., Hocking, A.D. & Pitt, J.J. Fungi and Mycotoxins in Stored Products: proceedings of an international conference in Bangkok, Thailand, 23–26 April 1991. ACIAR Proceedings No. 36: 194-197.

Giray B., Atasayar S. and Sahin G., 2009. *Determination of ochratoxin A and total aflatoxin levels in corn samples from Turkey by enzyme-linked immunosorbent assay*. Mycotoxin Research, 25, 113- 116.

Godič Torkar K., Vengušt A. 2008. *The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia*. Food Control, 19: 570–577.

Govaris, A., Roussi, V., Koudis, P. A. & Botsoglou, N. A. 2002. *Distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt*. Food Additives and Contaminants, No. 11, pp. (1043–1050)

Groopman, J.D., Hall, A.J., Whittle, H., Hudson, G.J., Wogan, G.N., Montesano, R. & Wild, C.P. 1992. *Molecular dosimetry of aflatoxin-N7-guanine in human urine obtained in The Gambia, West Africa*. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention, 1(3), 221-227,

Gurbay, A., Sabuncuoglu, S. A., Girgin, G., Sahin, G., Yigit, S., Yurdakok, M., et al. 2010. *Exposure of newborns to aflatoxin M1 and B1 from mothers' breast milk in Ankara, Turkey*. Food and Chemical Toxicology, 48, 314-319.

Gurbay, A., Aydın, S., Girgin, G., Engin, A. B., & Sahin, G. 2006. *Assessment of aflatoxin M1 levels in milk in Ankara, Turkey*. Food Control, No. 17, pp. (1-4)

Gursoy N. and Biciçi M., 2003. *Determination of fungal infections on wheat and maize grains and some of their mycotoxins in Cukurova region*. In: I National Mycotoxins Symposium. Instambul, Turkey, 68-74.

- Hamilton, P.B., 1978. *Fallacies in our understanding of mycotoxins*. J. Food Prot. 41:404.
- Harvey, R. B., Kubena L. F., Huff W. E., Corrier D. E., and Phillips T. D., 1988. *Progression of aflatoxicosis in growing barrows*. Am. J. Vet. Res. 49:482.
- Hayes J.D., Judah D.J., McLellan L.I., Neal G.E., 1991. *Contribution of the glutathione S-transferases to the mechanisms of resistance to aflatoxin B1*. Pharmacol Ther 50: 443–472.
- Hendrickse, R. G., Coulter, J. B. , Lamplugh, S. M., Macfarlane, S. B., Williams, T. E. Omer, M. I. and Suliman, G. I., 1982. *Aflatoxins and Kwashiokor: A study in Sudanese children*. Br. Med. J. (Clin. Res.) 285 (6345): 843-846.
- Henry S.H., Bosch F.X., Bowers J.C. *Aflatoxin, hepatitis and worldwide liver cancer risks*. Adv Exp Med Biol. 2002;504:229–233.
- Henry S.H., Bosch F.X., Troxell T.C., Bolger P.M., 1999. *Public health: Reducing liver cancer--global control of aflatoxin*. Science 286(5449):2453-2454.
- Herebian, D., Zühlke, S., Lamshöft, M., & Spiteller, M. 2009. *Multi-mycotoxin analysis in complex biological matrices using LC-ESI/MS: Experimental study using triple stage quadrupole and LTQ-Orbitrap*. Journal of Separation Science, 32(7), 939–948.
- Horn B.W., 2005. *Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil*. In: Aflatoxin and food safety. HK Abbas. Taylor & Francis Group, Boca Raton, London and New York, 95-116.
- Hsieh D. P. H., Wong Z. A., Wong J. J., Michas C. & Ruebner B. H., 1977. *Comparative metabolism of aflatoxin*. In *Mycotoxins in Human and Animal Health*. Edited by J. V. Rodricks, C. W. Hesseltine & M. A. Mehlman. p. 37. Pathotox Publishers Inc., Park Forest South, IL.

Hsieh D.P.H., 1985. *Characterization of water soluble glucuronide and sulfate conjugates of aflatoxin b 1 1 urinary excretion in monkey rat and mouse*. Food & Chemical Toxicology: 809-820

Hsieh D.P.H. & Wong J.J.,1982. *Metabolism and toxicity of aflatoxins*. In *Biological Reactive Intermediates-II B*. Chemical Mechanisms and Biological Effects, Part B. Advances in Experimental Medicine and Biology, eds Snyder, R., et al., vol. 136B, pp. 73-88, New York, Plenum Press

Hsieh, D.P.H., Salhab, A.S., Wong, J.J. & Yang, S.L. 1974. *Toxicity of aflatoxin Q1 as evaluated with the chicken embryo and bacterial auxotrophs*. Toxicology and Applied Pharmacology, 30(2) 237-242.

Hussain, I. & Anwar, J. 2008. *A study on contamination of aflatoxin M1 in raw milk in the Punjab province of Pakistan*. Food Control, No. 19, pp. (293-295)

Hussein S.H. and Brasel J.M., 2001. *Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals*. Toxicology. 167: 101-134.

Hussein, H. S. and Brassel, J. M., 2001. *Toxicity, Metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals*. Toxicology. 167: 101 – 134

IARC, 2002. *Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum, Lyon, France, pp. 1–556.

IARC, 1993. *Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic amines and mycotoxins*. IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Lyon, France, 56.

WHO, 2012. International programme on chemical safety environmental health criteria, 11. *Mycotoxins*, World Health Organization. Geneva, 1979.

Ioannou-Kakouri E., Aletrari M., Christou E., Ralli A., Koliou A. and Christofidou M., 2004. *Occurrence and control of mycotoxins in foodstuffs in Cyprus*. In: *An overview*

on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe. A Logrieco, A Visconti. Kluwer Academic, The Netherlands, 51-65.

Ioannou-Kakouri, E., Aletrari, M., Christou, E., Hadjioannou-Ralli, A., Koliou, A., and Akkelidou., D. 1999. *Surveillance and control of aflatoxins B1, B2,G1,G2, and M1 in foodstuffs in the Republic of Cyprus: 1992-1996.*

Jaimez, J., Fente, C. A., Vazquez, B. I., Franco, C. M., Cepeda, A., Mahuzier, G., et al. 2000. *Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis.* Journal of Chromatography A, 882(1-2), 1-10.

JECFA. 1998. *Safety evaluation of certain food additives and contaminants, WHO Food Additives Series 40, Aflatoxins.* In: The forty-ninth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva: World Health Organization.

Jouany, J., Diaz, D., 2005. *Effects of mycotoxins in ruminants.* In: Diaz, D.E. (Ed.), The Mycotoxin Blue Book. Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom, pp. 295-321.

Kos, J., , Lević, J., Đuragić, O., Kokić, B., Miladinović, I., 2014. *Occurrence and estimation of aflatoxin M1 exposure in milk in Serbia.* Food Control Volume 38, 41-46

Kamkar, A., 2005. *A study on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Sarab city of Iran.* Food Control, No. 16, pp. (593-599).

- Karami-Osboo, R., M. Mirabolfathy, R. Kamran, M. Shetab-Boushehri and S. Sarkari, 2012. *Aflatoxin B1 in maize harvested over 3 years in Iran*. Food Control., 23: 271-274.
- Kasper, C. B., & Gonzalez, F. J., 1982. in *Cancer Cell Organelles* (Reid, E., Cook, G. M. W., & Morre, D. J., Eds.) pp 202-214, Wiley, New York.
- Kensler, T.W., Gange, S.J., Egner, P.A., Dolan, P.M., Munoz, A., Groopman, J.D., Rogers, A.E. and Roebuck, B.D., 1997. *Predictive value of molecular dosimetry: individual versus group effects of oltipraz on aflatoxin-albumin adducts and risk of liver cancer*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 6, 603-610.
- Kim, E. K., Shon, D. H., Ryu, D., Park, J. W., Hwang, H. J., & 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.
- Krogh, P., 1977. *Mycotoxin tolerances in foodstuffs*. Pure and Applied Chemistry 49: 1719- 1721.
- Krska R., Schubert-Ullrich P., Molinelli A., Sulyok M., MacDonald S. and Crews C., 2008. *Mycotoxin analysis: An update*. Food Additives & Contaminants: Part A. 25, 152-163.
- Lin, J.K., Miller, J.A., Miller, E.C., 1977. *2, 3-Dihydro-2-(guan-7-yl)-3-hydroxy-aflatoxin B1, a major acid hydrolysis product of aflatoxin B1-DNA or -ribosomal RNA adducts formed in hepatic microsomal-mediated reactions and in rat liver in vivo*. Cancer Res. 1977 Dec; 37(12): 4430-4438
- Lindemann, M. D., Blodgett, D. J., Kornegay, E. T. and Schurig, G. G., 1993. *Potential ameliorators of aflatoxicosis in wean-ling growing swine*. J. Anim. Sci. 71:171.
- Lozano, M.C. & Diaz, G.J. 2006. *Microsomal and cytosolic biotransformation of aflatoxin B1 in four poultry species*. British Poultry Science, (47)6, 734-741.

Magan N., 2006. *Ecophysiology of biocontrol agents for improved competence in the phyllosphere*. In: Microbial Ecology of Aerial Plant Surfaces (M.J. Bailey, A.K. Lilley, T.M. Timms-Wilson, P.T.N. Spencer-Phillips, ed.), CABI International, Wallingford, UK, 150–164

Magan, N. and Aldred, D. 2007. *Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxicosis in the food chain*. International Journal of Food Microbiology 119, 131-139.

Magliulo, M., Mirasoli, M., Simoni, P., Lelli, R., Portanti, O., & Roda, A. 2005. *Development and validation of an ultrasensitive chemiluminescent enzyme immunoassay for aflatoxin M1 in milk*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 3300–3305.

Markaki, P., & Melissari, E. 1997. *Occurrence of aflatoxin M1 in commercial pasteurized milk determined with ELISA and HPLC*. Food Additives and Contaminants, 14(5), 451–456.

Martins, M. L.; & Martins, H. M. 2000. *Aflatoxin M1 in raw and ultra high temperature-treated milk commercialized in Portugal*. Food Additives and Contaminants, (17)10, 871-874.

Mašić, Z., Bočarov-Stančić, A. Sinovec, Z., Đilas, S. Adamović, M. 2003. *Mikotoksini u hrani za životinje u Republici Srbiji*. X Simpozijum tehnologije hrane za životinje, 290-298

McLean M., Dutton M.F., 1995. *Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update*. Pharmacol Ther. 65(2), 163-92.

Micco C., Grossi M., Onori R., Chirico M. and Brera C., 1986. *Monitoring for aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone in Italian maize of the 1982, 1983 and 1984 crops*. Rivista della Societa Italiana di Scienza dell'Alimentazione, 15, 113-116.

- Micheli, L., Greco, R., Badea, M., Moscone, D., & Palleschi, G. 2005. *An electrochemical immunosensor for Aflatoxin M1 determination in milk using screen-printed electrodes*. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(4), 588–596.
- Monbaliu, S., van Pioucke, C., Detavernier, C., Doumoultn, F., van Velde, M.D.E., Schoeters, E., et al., 2010. *Occurrence of mycotoxins in feed as analysed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 66-71.
- Moss, M. O. 1991. *The environmental factors controlling mycotoxin formation*. In: *Mycotoxins and Animal Foods*, J. E. Smith and R. S. Henderson (Eds.) CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Munoz, L., Cardelle, M., Pereiro, M. and Reiguera, R., 1990. *Occurrence of corn mycotoxins in Galicia (Northwest Spain)*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1004-1006.
- Nakazato, M., Morozumi, S., Saito, K., Fujinuma, K., Nishima, T., Kasai, N., 1990. *Interconversion of aflatoxin B1 and aflatoxicol by several fungi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 1465-1470.
- Neal, G. E., and Colley, P. J., 1979. *The formation of 2,3-dihydroxy-2,3-dihydro aflatoxin B1 by the metabolism of aflatoxin B1 in vitro by rat liver microsomes*. *FEBS Lett.* 101:382-386.
- Neal, G. E., Eaton, D. L., Judah, D. J. and Verna, A. 1998. *Metabolism and Toxicity of aflatoxins M1 and B1 in human-derived in vitro systems*. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 151(1),152-158
- Neldon-Ortiz, D. L., Qureshi, M. A., 1992. *The effects of direct and microsomal activated aflatoxin B1 on chicken peritoneal macrophages in vitro*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 31:61-67.

Nemati, M. A., Mehran, P. K., Hamed M.D., and Masoud, A. 2010. *A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in milk samples in Ardabil, Iran*. Food Control, (21)7. 1022–1024.

Newberne, P.M., Butler, W.H. 1969. *Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals*. Cancer Research 29:236-250.

Nizamlyodlu, F. and Oguz, H., 2003. *Occurrence of aflatoxins in layer feed and corn samples in Konya province, Turkey*. Food Additives and Contaminants, 20, 654-658.

Northolt, M.D., 1979. *The effect of water activity and temperature on the production of some mycotoxins*. PhD, Wageningen University, the Netherlands, Wageningen, 491.

Oruc, H.H., Cengiz, M. and Kalkanli, O., 2006. *Comparison of aflatoxin and fumonisin levels in maize grown in Turkey and imported from the USA*. Animal Feed Science and Technology, 128, 337- 341.

Oruc, H.H., Cengz, M. and Uzunoglu, I., 2007. *Occurrence of aflatoxin B1 and T-2 toxin in feed and raw ingredients used for animal feeding stuffs*. Veteriner Fakultesi Dergisi, Uludag Universitesi, 26, 1- 5.

Ozay, G. and Heperkan, D., 1989. *Mould and mycotoxin contamination of stored corn in Turkey*. Mycotoxin Research, 5, 81-89.

Papp, E., Otta, K.H. Zaray, G and Mincsovics, E., 2002. *Liquid chromatographic determination of aflatoxins*. Microchemical Journal, 73: 39–46.

Patterson, D.S.P., Anderson, P.H., 1982. *Recent aflatoxin feeding experiments in cattle*. Vet. Rec. 110:60–61.

Patterson, D.S.P., 1973. *Metabolism as a Factor in Determining the Toxic Action of the Aflatoxins in Different Animal Species*. Food and Cosmetics Toxicology 11:287-294.

Payne, G.A., 1998. *Process of contamination by aflatoxin producing fungi and their impacts on crops*. In: Mycotoxins in Agriculture and Food Safety. KK Sinha, D Bhatnagar. Marcel Dekker Inc., New York, 279-306.

Pepeljnjak, S. and Balzer, I., 1982. *A survey of mycological and mycotoxicological research on seeds in the nephropathic and anephropathic areas of Yugoslavia (Croatia)*. Symposium on the mycotoxins, Sarajevo, 14 XII 1979, 1982.

Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., Pavlovic, M. 1999. *Toxic effects of mycotoxins in Humans*. Bulletin of the World Health Organization. 77: 754- 766.

Pettersson, H., Holmberg, T., Larsson, K., and Kaspersson, A., 1989. *Aflatoxins in acid- treated grain in Sweden and occurrence of aflatoxin M1 in milk*. J. Sci. Food Agric. 48, 411-420.

Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L. and Piva, G., 2004. *Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in northern Italy*. Food Additives and Contaminants, 21, 479-487.

Pietri, A., and Diaz, G., 2003. *Personal communication*. Faculty of Agriculture UCSC, Piacenza, Italy.

Pildain, M.B., Cabral, D. and Vaamonde, G., 2005. *Aspergillus flavus populations in cultivated peanut from different agroecological zones of Argentina, toxigenic and morphological characterisation*. RIA, Revista de Investigaciones Agropecuarias, 34, 3-19.

Piva, G., Battilani, P. and Pietri, A., 2006. *Emerging issues in southern Europe: Aflatoxins in Italy*. In: The mycotoxin factbook. Food & feed topics. D Barug, D

Bhatnagar, HPv Egmond, JWvd Kamp, WAv Osenbruggen, A Visconti. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 139-153.

Raper, K.B. and Fennell, D.I., 1965. *The Genus Aspergillus*. Editor. Robert E. Krieger publishing company Inc., United States of America, 686 pp.

Rawal, S., Yip, S.S.M. & Coulombe, R.A., 2010. *Cloning, expression and functional characterization of cytochrome P450 3A37 from turkey liver with high aflatoxin B1 epoxidation activity*. Chemical Research in Toxicology, Vol.23, No.8, (August 2010), pp. 1322-1329.

Ren, Y., Zhang, Y., Shao, S., Cai, Z., Feng, L., Pan, H., et al. 2007. *Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1143(1-2), 48-64.

RHMZ, 2013. Republički hidrometeorološki Zavod, 2012. *Sezonski bilten za 2012. godinu*. Nacionalni centar za klimatske promene. Dostupno na <www.hidmet.gov.rs>

Republički zavod za statistiku, 2011. *Statistički godišnjak, 2011.*, Beograd, Republički zavod za statistiku.

Republički Zavod za statistiku, 2012, *Opštine i regioni u Republici Srbiji 2012*, Beograd, Republički zavod za statistiku.

Resnik, S., Costarrica, M.L. & Pacin, A. 1991. *Mycotoxins in Latin America and the Caribbean*. Food Control 6: 19-28.

Reyneri, A., 2006. *Mycotoxin alarm in maize grain*. Informatore Agrario, 62, 117-119.

Richard, J.L., 2007. *Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - an overview*. International Journal of Food Microbiology, 119 (1-2), 3-10

Rodriguez Velasco, M. L., Calonge Delso, M. M., & Ordonez Escudero, D. 2003. *ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M1 in raw cow's milk food*. Food Additives and Contaminants, 20(3), 276–280.

Roebuck, B.D., Siegel, W.G. and Wogan, G.N., 1978. *In vitro metabolism of aflatoxin B2 by animal and human liver*. Cancer Res. 38(4): 999-1002.

Rosner, H., 1998. *Mycotoxin regulations: an update*. Revue de Médecine Vétérinaire 149: 679–680.

Roussi, V., Govaris, A., Varagouli, A., and Botsoglou, N.A., 2002, *Occurrence of aflatoxin M1 in raw and market milk commercialized in Greece*. Food Additives and Contaminants, 19, 863-868.

Saito, M., Enomoto, M. and Tatsuno, T., 1971. *Yellowed rice toxins: luteroskyrin and related compounds, chlorine-containing compounds and citrinin*, p. 299-380. In A. Ciegler, S. Kadis, and S. J. Ajl (ed.), Microbial toxins, vol. VI: fungal toxins. Academic Press, New York, N.Y.

Sargeant, K., Carraghan, R.B. & Allcroft, R., 1963. *Toxic products in groundnuts*. Chemistry and origin. Chem. And Ind, pp.53-55

Sassahara, M., Netto, D.P. and Yanaka, E.K., 2005. *Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Parana state*. Food Chem. Toxicol., 43: 981-984.

Schardl, J., Jensen, H., Latge, J., 1996. *Epichloe festucae and related mutualistic symbionts on grasses*. Fungal genetics and biology 33, 69-82.

Scheidegger, K.A. and Payne, G.A., 2005. *Unlocking the secrets behind secondary metabolism: a review of Aspergillus flavus from pathogenicity to functional*

genomics. In: Aflatoxin and food safety. HK Abbas. Taylor & Francis Group, Boca Raton, London and New York, 137-165.

Schuller, P.L., Van Egmond, H.P., Stoloff, L. 1983. *Limits and regulations on mycotoxins*. In Naguib, K., Naguib, M.M., Park, D.L. & Pohland, A.E. Proceedings of the International Symposium on Mycotoxins, 6–8 September 1981, Cairo, Egypt. pp. 111-129.

Scudamore, K.A. and Patel, S., 2000. *Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom*. Food Additives and Contaminants, 17, 407-416.

Sizoo, E. A., & Van Egmond, H. P. 2005. *Analysis of duplicate 24-hour diet samples for aflatoxin B1, aflatoxin M1 and ochratoxin A*. Food additives and contaminants, 22(2), 163–172.

Službeni glasnik RS br. 109/09 i 45/10. *Uredba o nomenklaturi statističkih teritorijalnih jedinica*

Službeni glasnik RS broj 04/10. *Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje*

Službeni glasnik RS broj 20/13. *Izmene Pravilnika o maksimalno dozvoljenim količinama sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja.*

Službeni glasnik RS broj 28/11. *Pravilnik o dopuni Pravilnika o maksimalno dozvoljenim količinama sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja.*

Službeni list SRJ broj 11/92. *Izmene Pravilnika o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama.*

Službeni list SRJ broj 5/92. *Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama.*

Smith, J.W. and Hamilton, P.B., 1970. *Aflatoxicosis in the broiler chicken.* Poultry Sci. 49:207- 215.

Smith J. E., and Moss M. O., *Mycotoxins — Formation, Analysis and Significance.* 148 S., 54 Abb., 52 Tab. Chichester-New York-Brisbane-Toronto-Singapore 1985. John Wiley & Sons.

Sørensen, L.K., Elbæk, T.H., 2005. *Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry.* Journal of Chromatography B, 820:183–196

Southern, L.L., and Clawson, A.J., 1979. *Effects of aflatoxins on finishing swine.* J. Anim. Sci. 49:1006–1011.

Spanjer, M.C., Rensen, P.M., & Scholten, J.M., 2008. *LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs.* Food Additives and Contaminants, 25(4), 472–489.

Stoloff, L., Van Egmond, H.P. & Park, D.L. 1991. *Rationales for the establishment of limits and regulations for mycotoxins.* Food Additives and Contaminants 8: 213-222.

Stroka, J. and Anklam, E., 2002. *New strategies for the screening and determination of aflatoxins and the detection of aflatoxin-producing moulds in food and feed.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 21(2):90–95.

Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., & Schuhmacher, R., 2006. *Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the*

determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(18), 2649–2659.

Sulyok, M. Krska, R. & Schuhmacher, R., 2007. *A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol.389, No.5, pp. 1505–1523.

Swenson, D. H., Miller, E. C., and Miller, J. A., 1974. *Aflatoxin B1-2,3-oxide: Evidence for its formation in rat liver in vivo and by human liver microsomes in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 1036–1043.

Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Theil, P.G., Marasas, W.F.O., Stockenström, S., 1991. *Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 39, no. 11, 1991, p. 2014- 2018.

Tabuc, C., Marin, D., Guerre, P., Sesan, T. and Bailly, J.D., 2009. *Molds and mycotoxin content of cereals in southeastern Romania*. *Journal of Food Protection*, 72, 662-665.

Thirumala-Devi, K., Mayo, M. A., & Hall, A. J., 2002. *Development and application of an indirect competitive enzyme-linked immunoassay for aflatoxin M1 in milk and milk-based confectionery*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 933–937.

Tsakiris, I. N., Tzatzarakis, M. N., Alegakis, A. K., Vlachou, M. I., Renieri, E.A. & Tsatsakis, A.M., 2013. *Risk assessment scenarios of children's exposure to aflatoxin M1 residues in different milk type from the Greek market*. *Food & Chemical Toxicology*, 56 261-265.

- Udagawa T., Yuan J., Panigrahy D., Chang Y.H., Shah J., D'Amato R.J., 2000. *Cytochalasin E, an epoxide containing Aspergillus-derived fungal metabolite, inhibits angiogenesis and tumor growth.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 294:421–427
- Ueno Y., Kubota K., Ito T., Nakamura, Y., 1978. *Mutagenicity of carcinogenic mycotoxins in Salmonella typhimurium.* Cancer Res., 38, 536–542.
- Unusan, N., 2006. *Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey.* Food Chem. Toxicol., 44: 1897-1900.
- Van Egmond, H. P., 2004. *Natural toxins: Risks, regulation and the analytical situation in Europe.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378, 1152–1160.
- Van Egmond, H. P.; & Paulsch, W. E.; Veringa, H. A.; & Schuller, P. E., 1977. *The effect of processing on the aflatoxin M1 content of milk and milk products.* Archive Institutue, Pasteur Tunis, No. 54, pp. (381-390).
- Van Egmond, H.P. & Dekker, W.H., 1995. *Worldwide Regulations for Mycotoxins in 1994.* Natural Toxins 3: 332-336.
- Van Egmond, H.P., 1991. *Regulatory aspects of mycotoxins in Asia and Africa.* In Champ, B.R., Highley, E., Hocking, A.D. & Pitt, J.J. Fungi and mycotoxins in stored products: proceedings of an international conference, Bangkok, Thailand, 23-26 April 1991. ACIAR Proceedings No. 36: 198-204.
- Van Egmond, H.P., 1999. *Worldwide Regulations for Mycotoxins.* Working Document (MYC-CONF/99/8a) of the Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins. Tunis, Tunisia, 3-6 March 1999.
- Van Egmond, H.P., 1989. *Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard method of sampling and analysis.* Fd. Addit. Contam., 6: 139-188.

Veldman, A., 1992. *Effect of sorbentia on carry-over of aflatoxin from cow feed to milk*. *Milchwissenschaft*, 47: 777-780.

Whitaker T. B., 2006. *Sampling Foods for Mycotoxins*. *Food Addit Contam* 23: 50-61.

Whitaker, T. B., 2003. *Standardisation of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity*. *Food Control* 14(2003), 223-237.

Wicklow, D.T., 1995. *The mycology of stored grain: An ecological perspective*. In: Jayas, D.S., White, N.D.G., Muir, W.E. (Eds), *Stored Grain Ecosystems*. Marcel Dekker, New York, pp 197-249.

Wild, C.P., Hudson, G.J., Sabbioni, G., Chapot, B., Hall, A.J., Wogan, G.N., et al., 1992. *Dietary intake of aflatoxins and the level of albumin-bound aflatoxin in peripheral blood in The Gambia, West Africa*. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, (1)3, 229-234.

Willis, R.M., Mulvihill, J.J., Hoofnagle, J.H., 1980. *Attempted suicide with purified aflatoxin*. *Lancet*, 1198-1199.

Windham, G.L. & Williams, W.P., 1999. *Aflatoxin accumulation in commercial corn hybrids in 1998*. *Mississippi Agric. and Forestry Exp. Stn. Res. Rep.*, (22)8, 4.

Windham, G.L., W.P. Williams & F.M. Davis., 1999. *Effects of southwestern corn borer on *Aspergillus flavus* kernel infection and aflatoxin accumulation in maize hybrids*. *Plant Dis.* 83: 535-540.

Wiseman, D.W., & marth, E.H., 1983. *Heat and acid stability of aflatoxin M1 in naturally and artificially contaminated milk*. *Milchwissenschaft*, 38, 464-466.

Wogan, G.N., 1966. *Chemical nature and biological effects of the aflatoxins*. *Bacteriological Reviews*, 30(2), p460.

Wong, Z.A. & Hsieh, D.P.H., 1978. *Aflatoxicol: major aflatoxin BI metabolite in rat plasma*. Science, N.Y. 200, 325.

Yousef, A.E., & Marth, E.H., 1989. *Stability and degradation of aflatoxin M1*. In H.P. Van Egmond, *Mycotoxins in dairy products*, 127-161. London, Elsevier.

Zöllner, P., & Mayer-Helm, B., 2006. *Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1136(2), 123-169.

Analiza varijanse rezultata određivanja količine AFB₁ u kukuruzu za tri regije

	Stepen slobode	Zbir kvadrata	Srednji kvadrat	F vrednost	p
Regija	2	3150,3	1575,16	0,6905	0,5017
Greška	677	1544303,0	2281,10		
Ukupno	679	1547453,3			

Srednje vrednosti za jednofaktorsku ANOVA-u

Regija	Br. uzoraka	Srednja vrednost	Stand. greška	Donja granica 95% i.p.	Gornja granica 95% i.p.
Beogradska	77	28,0649	5,4429	17,378	38,752
Centralna Srbija	169	29,1065	3,6739	21,893	36,320
Vojvođanska	434	33,2189	2,2926	28,717	37,720

Razlika srednjih kvadrata

Abs(Dif)-LSD	Vojvođanska	Centralna Srbija	Beogradska
Vojvođanska	-6,366	-4,391	-6,442
Centralna Srbija	-4,391	-10,202	-11,852
Beogradska	-6,442	-11,852	-15,114

Pozitivne vrednosti ukazuju na parove koji se statistički značajno razlikuju.

Regija	Srednja vrednost
Vojvođanska	A
Centralna Srbija	A
Beogradska	A

Nivoi koje povezuju različita slova se statistički značajno razlikuju.

Statistički značajne razlike po regijama

Regija 1	Regija 2	Razlika	Razlika Std. greške	Donji i.p.	Gornji i.p.	p
Vojvođanska	Beogradska	5,153959	5,905982	-6,4423	16,75020	0,3832
Vojvođanska	Centralna Srbija	4,112385	4,330543	-4,3905	12,61529	0,3426
Centralna Srbija	Beogradska	1,041574	6,566754	-11,8521	13,93523	0,8740

Analiza varijanse rezultata određivanja količine AFM1 u mleku za tri perioda uzorkovanja

	Stepen slobode	Zbir kvadrata	Srednji kvadrat	F vrednost	p
Period	2	73,9815	36,9908	109,1832	<,0001*
Greška	6622	2243,5021	0,3388		
Zbir	6624	2317,4836			

Srednje vrednosti za jednofaktorsku ANOVA-u

Periodi	Br. uzoraka	Srednja vrednost	Stand. greška	Donja granica 95% i.p.	Gornja granica 95% i.p.
1	2404	2,01480	0,01187	1,9915	2,0381
2	2832	1,83236	0,01094	1,8109	1,8538
3	1389	2,08335	0,01562	2,0527	2,1140

Razlika srednjih kvadrata

Abs(Dif)-LSD	1	2	3	Period	Srednja vrednost
3	-0,04330	0,03009	0,21362	3	2,0833540
1	0,03009	-0,03291	0,15080	1	2,0148049
2	0,21362	0,15080	-0,03032	2	1,8323580

Pozitivne vrednosti ukazuju na parove koji se statistički značajno razlikuju.

Nivoi koje povezuju različita slova se statistički značajno razlikuju.

Statistički značajne razlike po periodima

Period	Period	Razlika	Razlika Std. greške	Donji i. p.	Gornji i. p.	p
3	2	0,2509959	0,0190668	0,2136188	0,2883731	<,0001*
1	2	0,1824469	0,0161419	0,1508036	0,2140902	<,0001*
3	1	0,0685490	0,0196174	0,0300926	0,1070055	0,0005*

Analiza varijanse rezultata određivanja količine AFM1 u mleku za tri regije RS

	Stepen slobode	Zbir kvadrata	Srednji kvadrat	F vrednost	p
Regija	2	5,52686	2,76343	55,7973	<,0001*
Greška	6517	322,76260	0,04953		
Ukupno	6519	328,28947			

Srednje vrednosti za jednofaktorsku ANOVA-u

Regija	Broj uzoraka	Srednja vrednost	Stand. Greška	Donja granica 95% i.p.	Gornja granica 95% i.p.
Beogradska	3838	0,184025	0,00359	0,17698	0,19107
Centralna Srbija	784	0,116625	0,00795	0,10104	0,13221
Vojvođanska	1898	0,216292	0,00511	0,20628	0,22631

Razlika srednjih kvadrata

Abs(Dif)-LSD	Vojvođanska	Centralna Srbija	Beogradska	Regija	Srednja vrednost	
Vojvođanska	-0,01416	0,08115	0,02003	Vojvođanska	A	0,21629241
Centralna Srbija	0,08115	-0,02203	0,05030	Beogradska	B	0,18402527
Beogradska	0,02003	-0,05030	-0,00996	Centralna Srbija	C	0,11662500

Pozitivne vrednosti ukazuju na parove koji se statistički značajno razlikuju.

Nivoi koje povezuju različita slova se statistički značajno razlikuju.

Statistički značajne razlike po regijama

Regija 1	Regija 2	Razlika	Razlika Std. greške	Donji i.p.	Gornji i.p.	p
Vojvođanska	Centralna Srbija	0,0996674	0,0094480	0,0811462	0,1181886	<,0001*
Beogradska	Centralna Srbija	0,0674003	0,0087221	0,0503021	0,0844985	<,0001*
Vojvođanska	Beogradska	0,0322671	0,0062448	0,0200252	0,0445091	<,0001*

BIOGRAFIJA

Srđan Stefanović rođen je 07.07.1973. u Pančevu. Osnovnu i srednju školu završio je u Negotinu. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je školske 1992/1993. godine, a diplomirao 2000. godine. Doktorske studije upisao je 2006. godine na Fakultetu veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, naučna oblast: higijena i tehnologija namirnica animalnog porekla.

Od 2001. godine, zaposlen je u Institutu za higijenu i tehnologiju mesa u Beogradu. Od 2004. godine bavi se ispitivanjem i određivanjem rezidua veterinarskih lekova i kontaminenata okoline u namirnicama animalnog porekla i hrani za životinje. Razradio je i validovao metode za određivanje hinolona, tetraciklina, makrocikličnih laktona, ohratoksina A, aflatoksina B1, aflatoksina M1 i dr. Vlada instrumentalnim tehnikama kao što su gasna i tečna hromatografija, masena spektrometrija, atomska apsorpciona spektrofotometrija i ICP-masena spektrometrija.

Učesnik je stručnih skupova u organizaciji referentnih laboratorija Evropske Unije u oblasti razrade, validacije i unapređenja analitičkih metoda za određivanje rezidua veterinarskih lekova. Od 2007. godine, član je komisije za farmakovigilansu veterinarskih lekova Agencije za lekove i medicinska sredstva Republike Srbije.

Koautor je više od 10 naučnih radova objavljenih u časopisima međunarodnog značaja. Pored objavljenih radova bio je učesnik u dva naučno-istraživačka projekta iz oblasti tehnološkog razvoja. Od 2011. godine učesnik je III projekta pod nazivom: „Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu“, ev. br. 46009.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a _____ Srđan M. Stefanović _____

broj indeksa _____ 14/13 _____

Izjavljujem

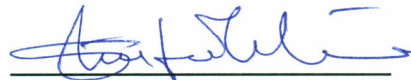
da je doktorska disertacija pod naslovom

“Uporedno ispitivanje prisustva aflatoksina B₁ u hrani za životinje i aflatoksina M₁ u mleku”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 07. april 2014.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora : Srđan M. Stefanović

Broj indeksa : 14/13

Studijski program: Higijena i tehnologija namirnica animalnog porekla

Naslov rada

``Uporedno ispitivanje prisustva aflatoksina B₁ u hrani za životinje i aflatoksina M₁ u mleku``

Mentor : dr Jelena Nedeljković - Trailović

Potpisani/a : Srđan M. Stefanović

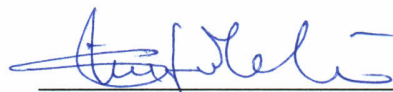
Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 07. april 2014.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Uporedno ispitivanje prisustva aflatoksina B₁ u hrani za životinje i aflatoksina M₁ u mleku“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 07. april 2014.

