



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«Μελέτη της παρουσίας αφλατοξίνης M1 σε δείγματα  
τυριού ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ»**

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΤΡΑΧΑΝΑΣ**

**ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ ΠΘ**

**Λάρισα, Φεβρουάριος 2021**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
«Μελέτη της παρουσίας αφλατοξίνης M1 σε δείγματα  
τυριού ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ»**

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΤΡΑΧΑΝΑΣ  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ ΠΘ  
Λάρισα, Φεβρουάριος 2021**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Νικόλαος Σολωμάκος: Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα  
Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων)**

**Αλέξανδρος Γκόβαρης: Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

**Ανδρέα Πεζαρά: Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Κτηνιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τραχανάς Αλέξανδρος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Τμήμα Ιατρικής 2020

### Μελέτη της παρουσίας αφλατοξίνης M1 σε τυρί «METSOBONE»

**Λέξεις Κλειδιά:** αφλατοξίνη M1, μυκοτοξίνες, τυρί, μετσοβόνη

Το τυρί «METSOBONE» (METSOVONE) είναι ένα ελληνικό τυρί με «προστατευόμενη ονομασία προέλευσης» (Π.Ο.Π) που παράγεται παραδοσιακά στην περιοχή της επαρχίας Μετσόβου του Νομού Ιωαννίνων από γάλα αγελαδινό ή μίγμα αυτού με πρόβειο και γίδινο, τα οποία τελευταία δεν υπερβαίνουν το 20% συνολικά κατά βάρος. Το γάλα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του «METSOBONE» προέρχεται αποκλειστικά από την περιοχή αυτή, καθώς και από ζώα φυλών προσαρμοσμένων στην περιοχή, που διατρέφονται από την τοπική χλωρίδα της περιοχής. Συνεπώς, η παραγωγή ασφαλών προϊόντων είναι εξαιρετικά σημαντική τόσο για τη Δημόσια Υγεία όσο και για την τοπική οικονομία της περιοχής.

Η αφλατοξίνη M1 (AFM1) αποτελεί ένα σημαντικό βιολογικό κίνδυνο για τα γαλακτοκομικά προϊόντα, αφού μπορεί να εκκριθεί με το γάλα και είναι αρκετά ανθεκτική στις συνήθεις διαδικασίες που εφαρμόζονται κατά την παραγωγή τέτοιων προϊόντων. Η AFM1 σύμφωνα με τον διεθνή οργανισμό έρευνας κατά του καρκίνου (IARC) ταξινομείται στην κατηγορία 2B, ως «πιθανά καρκινογόνος ουσία για τον άνθρωπο».

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν μελέτη της παρουσίας αφλατοξίνης M1 σε δείγματα «METSOBONE».

Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν 30 δείγματα τυριού, 20 δείγματα αφορούσαν το μετσοβόνη παραγωγής του ιδρύματος «Τοσίτσα» που αποτελεί και την κύρια παραγωγική μονάδα του προϊόντος και 10 δείγματα από μικρούς ιδιοπαραγωγούς. Τα δείγματα αναλύθηκαν με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε κανένα από τα 30 δείγματα που εξετάστηκαν (0%) δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία της AFM1 σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 50 ppt που προβλέπεται στην νομοθεσία. Μόλις σε 3 δείγματα (10%) που προέρχονταν από μικρούς παραγωγούς, ανιχνεύθηκε παρουσία της AFM1 σε συγκεντρώσεις πολύ χαμηλότερες από το νομοθετικό όριο. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη της αποτελεσματικότητας της εφαρμογής των κατάλληλων διαδικασιών για την παραγωγή του ελληνικού αυτού ΠΟΠ τυριού, ιδιαίτερα στις μεγάλες εγκαταστάσεις παραγωγής του προϊόντος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός προϊόντος υψηλής ασφάλειας για τον καταναλωτή. Σε ορισμένες εγκαταστάσεις θα μπορούσε να προταθεί η εφαρμογή συχνότερων ελέγχων των ζωοτροφών σε επίπεδο εκτροφής, αλλά και του παραγόμενου γάλακτος.

## **ABSTRACT**

**Keywords:** aflatoxin M1, mycotoxins, cheese, METSOVONE

Metsovone is a semi-hard and naturally smoked cheese, which is produced in the region of Metsovo (Epirus, Greece) and is protected as a designation of origin product (PDO). Metsovone is one of the few PDO cow's milk cheeses in Greece, made from either raw or pasteurized cow's milk or a combination of 80% cow's milk and up to 20% raw or pasteurized sheep's and/or goat's milk.

Aflatoxin M1 (AFM1) is an important biological hazard for milk products. According to the International Agency for Research on Cancer (IARC), AFM1 is classified in category 2B, as a possible carcinogen for humans.

The aim of the present thesis was to study the contamination levels with AFM1 of METSOVONE samples.

30 cheese samples were collected (20 produced by the "TOSITSA FOUNDATION", which is the largest producer of the product and 10 from some local small level producers). The determination of AFM1 was based on indirect immunoenzymatic ELISA method with the analytical package Ridascreen Aflatoxin M1 (R-Biopharm, Germany), strictly following the manufacturer's instructions.

The results of the study showed that in all samples tested, the levels of AFM1 were lower than the tolerable maximum level of 50 ng/kg.

In conclusion, METSOVONE cheese products are safe for consumption, regarding the AFM1.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	<b>i</b>
<b>ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ</b> .....	<b>ii</b>
<b>ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ</b> .....	<b>ii</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>iv</b>
<b>ΜΕΡΟΣ 1<sup>ο</sup></b> .....	<b>1</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup> : Ο ΚΛΑΔΟΣ ΤΗΣ ΤΥΡΟΚΟΜΙΑΣ ΣΤΗ ΧΩΡΑ ΜΑΣ</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΤΥΡΟΚΟΜΙΑΣ: «ΑΠΟ ΤΟ ΧΘΕΣ ΣΤΟ ΣΗΜΕΡΑ»</b> ...	<b>1</b>
<b>1.2 Η ΕΛΛΑΔΑ ΣΤΟ ΧΑΡΤΗ ΤΗΣ ΤΥΡΟΚΟΜΙΑΣ</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ &amp; ΓΑΛΑΚΤΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ</b> .....	<b>8</b>
1.4.1 ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ ΓΑΛΑ .....	8
1.4.2 ΠΡΟΒΕΙΟ ΓΑΛΑ .....	9
1.4.3 ΑΙΓΕΙΟ ΓΑΛΑ .....	9
<b>1.5 ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ</b> .....	<b>10</b>
1.5.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ .....	10
1.5.2 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΟ ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ;.....	11
1.5.3 ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ.....	11
1.5.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ .....	11
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup> : ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2 ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ</b> .....	<b>14</b>
2.2.1 ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΑ ΦΥΤΑ .....	14
2.2.2 ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΙΣ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ.....	18
<b>2.3 Η ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ</b> .....	<b>19</b>
2.3.1 Η ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΩΝ ΖΩΩΝ.....	19
2.3.2 Η ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ.....	22
<b>2.4 ΕΙΔΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ</b> .....	<b>23</b>

2.4.1	ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ .....	25
2.4.2	ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΗ.....	28
2.4.3	ΤΡΙΧΟΘΕΣΙΝΗ.....	31
2.4.4	ΖΕΑΡΑΛΕΝΟΝΗ.....	32
2.4.5	ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ.....	34
2.4.6	ΑΛΛΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	58
<b>ΜΕΡΟΣ 2<sup>ο</sup>.....</b>		<b>61</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ.....</b>		<b>61</b>
3.1	ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ .....	61
3.2	ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Μ1 ΣΤΟ ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ.....	61
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup> : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΣΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>		<b>63</b>
4.1	ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	63
4.2	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	65
4.3	ΣΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	70
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>		<b>71</b>

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, του Τμήματος Κτηνιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η εργασία αυτή διεκπεραιώθηκε υπό την συνεχή επίβλεψη του κ. Νικόλαου Σολωμάκου, Επίκουρου Καθηγητή του εργαστηρίου, προς τον οποίο θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου για την διαρκή παρακολούθηση, την σωστή και υπεύθυνη καθοδήγηση, την αδιάκοπη και φιλική συνεργασία και ενθάρρυνση σε όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ επίσης για την προτροπή του στην επιλογή του θέματος της μελέτης, καθ' ότι αποκόμισα γνώση και εμπειρία που θα βοηθήσουν στην μετέπειτα πορεία μου.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κ. Γκόβαρη Αλέξανδρο, Καθηγητή, και την κα. Πεξαρά Ανδρεάνα, Επίκουρη Καθηγήτρια, του Εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, για την αμέριστη βοήθειά τους, την πολύτιμη συμβουλευτική τους υποστήριξη και καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης αυτής.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω και το υπόλοιπο ανθρώπινο δυναμικό, εκπαιδευτικό και μη, του μεταπτυχιακού προγράμματος, για την άψογη και συνεχή συνεργασία, την άριστη επιστημονική κατάρτιση και συμβουλευτική δράση του καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος.

Τέλος, κρίνω σκόπιμο να ευχαριστήσω τα μέλη της οικογένειάς μου και τη σύντροφό μου για την συνεχή υποστήριξη, την υπομονή, την κατανόηση και την συμπαράσταση που έδειξαν όλο αυτό το χρονικό διάστημα, καθώς αποτέλεσαν αρωγούς στην διεκπεραίωση αυτής της εργασίας και κατ' επέκταση στην ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών.



## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1.1:</b> Ελληνικά Τυριά ΠΟΠ.....	<b>6</b>
<b>Πίνακας 2.1:</b> Οι σημαντικότερες μυκοτοξίνες και οι τροφές στις οποίες βρίσκονται, οι μύκητες που τις παράγουν και την επίπτωση τους στην υγεία του ανθρώπου και των ζώων ( adapted from WHO: Basic food safety for health workers , Liu Gt et al., 1991; Flieger M et al., 1997).....	<b>24</b>
<b>Πίνακας 2.2:</b> Είδη μυκήτων, μυκοτοξίνες που παράγουν και κυριότεροι μεταβολίτες των μυκοτοξινών στον οργανισμό (adapted from: Κουρουσέκος, 2008).....	<b>25</b>
<b>Πίνακας 2.3:</b> Επίδραση των αφλατοξινών στο σωματικό βάρος και στις βιοχημικές παραμέτρους του αίματος διαφόρων ειδών (adapted from: Κουρουσέκος 2011).....	<b>42</b>
<b>Πίνακας 4.1:</b> Αποτελέσματα της μελέτης, όπου παρατίθενται το είδος και ο αριθμός των δειγμάτων , καθώς και η συγκέντρωση της AFM1 που προσδιορίστηκε σε αυτά...	<b>63</b>
<b>Πίνακας 4.2:</b> Παρουσίαση αποτελεσμάτων ερευνών από διάφορες χώρες σε διάφορα είδη τυριών για την ανίχνευση AFM1 (MPL & MRL < 50 ppt είναι το ανώτερο επιτρεπτό όριο συγκέντρωσης αφλατοξίνης για την Ευρωπαϊκή Ένωση , EC: No 1881/2006 ).....	<b>67</b>

## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1.1:</b> Χρήση του γάλακτος στην ΕΕ (adapted from: Eurostat 2018).....	<b>4</b>
<b>Εικόνα 1.2:</b> Η εγχώρια παραγωγή τυριών ανά κατηγορία προϊόντων για το έτος 2017 ( adapted from: ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ, Επεξεργασία στοιχείων ICAP ).....	<b>6</b>
<b>Εικόνα 1.3:</b> Η μέση μηνιαία δαπάνη (%) των νοικοκυριών για είδη διατροφής, 2017 ( adapted from: ΕΛΣΤΑΤ).....	<b>7</b>
<b>Εικόνα 1.4:</b> Χώρες εξαγωγής των ελληνικών τυριών την χρονική περίοδο 2019. Η χρωματική κλίμακα υποδεικνύει το ποσοστό διάθεσης των ελληνικών τυριών σε κάθε χώρα. ( adapted from: TrendEconomy: Merchandise Exports by Country (HS02), 2020).....	<b>8</b>
<b>Εικόνα 2.1:</b> Κατάταξη των μυκήτων στο στάδιο εμφάνισης και κυριαρχίας τους πριν και μετά την συγκομιδή των καλλιεργειών. Η πάνω οριζόντια κλίμακα αντιπροσωπεύει την εναλλακτική ταξινόμηση των μυκήτων στους σπόρους με βάση την ανάγκη τους σε ενεργότητα ύδατος (aw) για να αναπτυχθούν ( adapted from: Mohamed Manna & Ki Deok Kim, 2017).....	<b>16</b>
<b>Εικόνα 2.2:</b> Ελάχιστη και βέλτιστη θερμοκρασία (°C) και ενεργότητα ύδατος (aw) για την αναπτυξη των μυκήτων και την παραγωγή των μυκοτοξινών (adapted from: Mohamed Manna & Ki Deok Kim, 2017).....	<b>16</b>

<b>Εικόνα 2.3:</b> Χημικές δομές της Ωχρατοξίνης (σκούρο μπλε: μέρος φαινυλαλανίνης, κόκκινο: δακτύλιος διϋδρο-ισοκουμαρίνης, πράσινο: όξινα υδρογόνα), Β και Γ. Οι επισημασμένες δομές είναι χαρακτηριστικές για τα τρία διαφορετικά μόρια ωχρατοξίνης (ανοιχτό μπλε).....	<b>27</b>
<b>Εικόνα 2.1:</b> Αποτελέσματα της μελέτης, όπου παρατίθενται το είδος και ο αριθμός των δειγμάτων , καθώς και η συγκέντρωση της AFM1 που προσδιορίστηκε σε αυτά.....	<b>29</b>
<b>Εικόνα 2.5:</b> φιαλίδια που φέρουν αλυσίδες μικρομικωνιδίων, από αριστερά προς τα δεξιά η λευκή μπάρα είναι 50μm, 10μm, 10μm. Στην δεξιά εικόνα αποικονίζονται μικρο-, μακροκονίδια.....	<b>29</b>
<b>Εικόνα 2.6:</b> Χρονοδιάγραμμα για βασικά γεγονότα στην ανακάλυψη, τοξικολογική αξιολόγηση, μοριακή επιδημιολογία και ρύθμιση των αφλατοξινών. (FDA: Food and Drug Administration, IARC: Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο, IAC: χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας, CHL: χλοροφυλλίνη.) (adapted from: Thomas W. Kensler et al., 2010).....	<b>35</b>
<b>Εικόνα 2.7:</b> Οι χημικοί τύποι αφλατοξινών (adapted from: Zhang et al., 2014).....	<b>37</b>
<b>Εικόνα 2.8:</b> Σύγκριση διαφορετικών μεθόδων ανάλυσης αφλατοξίνης (adapted from: Alex P. Wacoo et al., 2014).....	<b>48</b>

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μυκοτοξίνες είναι δευτερεύοντες μεταβολίτες των μυκήτων, που έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στον άνθρωπο, τα ζώα και τις καλλιέργειες, που οδηγούν σε ασθένειες και οικονομικές απώλειες. Η μόλυνση των τροφίμων και των ζωοτροφών με μυκοτοξίνες είναι ένα σημαντικό πρόβλημα παγκοσμίου εμβέλειας. Οι αφλατοξίνες, οι ωχρατοξίνες, οι τριχοθεσίνες, η ζεαραλενόνη, οι φουμονισίνες και τα αλκαλοειδή του εργοτισμού είναι οι μυκοτοξίνες μεγαλύτερης αγροοικονομικής σημασίας. Οι μυκοτοξίνες έχουν οξεία ή/και χρόνια επίδραση στον άνθρωπο και στα ζώα (ειδικά μονογαστρικά). Οι οικονομικές επιπτώσεις των μυκοτοξινών περιλαμβάνουν απώλεια ανθρώπινων και ζωικών ζώων, αυξημένο κόστος υγειονομικής περίθαλψης και κτηνιατρικής φροντίδας, μειωμένη παραγωγή ζωικού κεφαλαίου, διάθεση μολυσμένων τροφίμων και ζωοτροφών και επενδύσεις σε έρευνα και εφαρμογές για τη μείωση της σοβαρότητας του προβλήματος της μυκοτοξίνης.

Η αφλατοξίνη σχετίζεται τόσο με τοξικότητα όσο και με καρκινογένεση σε ανθρώπους και ζώα. Οι ασθένειες που προκαλούνται από την κατανάλωση αφλατοξίνης ονομάζονται αφλατοξικώσεις. Η οξεία αφλατοξίκωση οδηγεί σε θάνατο. Η χρόνια αφλατοξίκωση οδηγεί σε καρκινογένεση, καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος και σε άλλες «αργές» παθολογικές καταστάσεις. Οι αφλατοξίνες (AF) είναι δευτερεύοντες μεταβολίτες με υψηλή τοξικότητα που συντίθενται από τα *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus* που παράγονται σε διάφορες ζωοτροφές, όπως καλαμπόκι, βαμβακόσπορος, φιστίκια κ.τ.λ.. Η αφλατοξίνη B1 (AFB1) είναι το πιο κοινό και καρκινογόνο μέλος στην οικογένεια AF και ο οργανισμός IARC (Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο) πρότεινε ότι η AFB1 πρέπει να ταξινομηθεί ως καρκινογόνο της Ομάδας I. Ένα άλλο σημαντικό μέλος της οικογένειας AF, η αφλατοξίνη M1 (AFM1), είναι το 4-υδρόξυ παράγωγο της AFB1 και μπορεί να απεκκρίνεται στο γάλα των ζώων κατά τη γαλουχία και κατ' επέκταση να ανευρεθεί στο γάλα και στα προϊόντα του. Η AFM1 θεωρείται επίσης πιθανά καρκινογόνο και επιβλαβές για τον άνθρωπο, ομάδα 2B κατά IARC.

Καθώς το γάλα και τα προϊόντα του αποτελούν αδιαμφισβήτητα αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής μας, γίνεται φανερό πως ο κίνδυνος της έκθεσής μας στις μυκοτοξίνες και ιδιαίτερα στις αφλατοξίνες είναι μεγάλος. Συνεπώς, αντιλαμβάνεται κανείς την σημαντικότητα της ύπαρξης διαρκών ελέγχων των τροφίμων και την ανάπτυξη μέτρων για την πρόληψη, την αντιμετώπιση και την εξάλειψή τους από τα τρόφιμα. Η καθιέρωση τέτοιων ελέγχων και μέτρων, πρέπει να γίνει μέσω της εφαρμογής προληπτικών συστημάτων ελέγχου, που βασίζονται στην ανάλυση επικινδυνότητας σε όλα τα στάδια της παραγωγής και όχι μόνο στο τελικό προϊόν, καθότι η πρωτογενής παραγωγή αποτελεί την πηγή επιμόλυνσης ενός τροφίμου. Δεδομένου ότι φυσικοί, βιολογικοί και χημικοί παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν την ασφάλεια και την καταλληλότητα των τροφίμων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανίχνευση της παρουσίας αφλατοξίνης M1 σε δείγματα τυριού «METSOBONE». Ειδικότερα, η μελέτη παρουσιάζει την κατάσταση της τυροκομίας στην Ελλάδα (Κεφάλαιο 1ο) και περιγράφει στη συνέχεια (Κεφάλαιο 2ο) της κυριότερες μυκοτοξίνες, με έμφαση στις αφλατοξίνες, καθώς αποτελούν

αντικείμενο τόσο της συγκεκριμένης μελέτης όσο και της ευρύτερης επιστημονικής κοινότητας. Τέλος στο δεύτερο μέρος της μελέτης, περιγράφεται η διαδικασία της πειραματικής ανάλυσης των 30 δειγμάτων «METSOBONE» (Κεφάλαιο 3ο ) καθώς και η παράθεση των αποτελεσμάτων και των συμπερασμάτων ( Κεφάλαιο 4ο ). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων της Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## ΜΕΡΟΣ 1<sup>ο</sup>

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>: Ο ΚΛΑΔΟΣ ΤΗΣ ΤΥΡΟΚΟΜΙΑΣ ΣΤΗ ΧΩΡΑ ΜΑΣ

#### 1.1 Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΤΥΡΟΚΟΜΙΑΣ: «ΑΠΟ ΤΟ ΧΘΕΣ ΣΤΟ ΣΗΜΕΡΑ»

Η προέλευση του τυριού και η ακριβής χρονολογική τοποθέτηση της εμφάνισής του παραμένει μέχρι στιγμής ένα μυστήριο και για τους ειδικούς. Στην Ελληνική μυθολογία οι Θεοί του Ολύμπου, αναφέρεται ότι έκαναν στον άνθρωπο « δώρο με παντοτινή αξία » και αυτό ήταν το τυρί. Σύμφωνα με κοινωνιολογικές μελέτες αναφέρετε ότι μαζικές εισροές από κτηνοτρόφους της Μέσης Ανατολής, περίπου το 7.000 π.Χ., στην Ευρώπη μέσω Βοσπόρου, μαζί με τα βοοειδή και τους χοίρους, που εξέτρεφαν, εγκαταστάθηκαν στους βοσκότοπους της Ευρώπης, καθώς ήταν πλουσιότεροι από τους δικούς τους. Η ανακάλυψη της τυροκόμησης πιστεύεται πως έγινε τυχαία, περίπου 8.000 χρόνια πριν, με την πρώτη παραγωγή τυροκομικών προϊόντων να ξεκινά σε μικρές οικογενειακές βιοτεχνίες. Η ανάπτυξη όμως της κτηνοτροφίας καθώς και η απόκτηση γνώσεων χημείας και μικροβιολογίας άλλαξαν τον τρόπο παρασκευής. Η παρασκευή τυροκομικών προϊόντων γίνεται πλέον σε υπερσύγχρονες εγκαταστάσεις όπου τυροκομείται κυρίως αιγοπρόβειο και αγελαδινό γάλα (Wikipedia).

Γύρω στο 7.000 π.Χ., την περίοδο όπου ο άνθρωπος είχε κάνει τα πρώτα επιτυχή βήματα στην εξημέρωση των ζώων, πιθανολογείτε η εμφάνιση του τυριού στην περιοχή μεταξύ των ποταμών Τίγρη και Ευφράτη, στο σημερινό Ιράκ. Υπάρχουν 2 θεωρίες για το πώς ανακαλύφθηκε και ξεκίνησε έπειτα η παραγωγή του τυριού. Η πρώτη, αν και πιθανόν να αποτελεί λαϊκό μύθο, υποστηρίζει ότι η ανακάλυψη του τυριού οφείλεται σε ένα νομά της εποχής. Ο νομάς επρόκειτο να πραγματοποιήσει ταξίδι στην έρημο με την καμήλα του και είχε προμηθευτεί μαζί του το σακί του , που ήταν φτιαγμένο από την μεγάλη κοιλία ενός προβάτου, το οποίο το είχε γεμίσει με γάλα. Όταν σταμάτησε μετά από κάποιες ώρες επιχείρησε να πιεί λίγο από το γάλα. Προς έκπληξή του το γάλα είχε διαχωριστεί σε δύο φάσεις, μία στερεή ( το τυρόπηγμα) και σε μία υδαρή γαλακτώδης ( ο ορός γάλακτος ) (I.D.F.A, The Gourmet Cheese Detective). Στη θεωρία αυτή, οι παράγοντες που συντέλεσαν στην δημιουργία του τυριού και οδήγησαν στην ανακάλυψή του ήταν το γάλα , οι αναταράξεις, «κινήσεις ανάδευσης», από τον βηματισμό της καμήλας, η υψηλή θερμοκρασία της ερήμου και τα ένζυμα του ηνύστρου, κυρίως της ρεννίνης (Silanikove Nissim et al., 2015; National Historic Cheesemaking Center). Η δεύτερη θεωρία προτείνει ότι όταν πρόσφεραν στους θεούς της εποχής γάλα, αυτό γινόταν παχύρευστο όσο περισσότερο παρέμενε εκτεθειμένο στην αυξημένη θερμότητα του περιβάλλοντος. Έτσι παρατήρησαν πως αν το τοποθετούσαν σε ένα δοχείο, φτιαγμένο από στομάχι ενός προβάτου, να «αποστραγγίζει», το γάλα μετατρέπονταν σε μια σφικτή μάζα , ένα πολύ μαλακό τυρί ( The Gourmet Cheese Detective).

Οι πρώτες γραπτές ενδείξεις για το τυρί είναι από τους Σουμέριους (The Nibble, 2005), γραμμένες στην σφηνοειδή γραφή, της Τρίτης Δυναστείας του Ουρ, που χρονολογούνται στις αρχές της δεύτερης χιλιετίας π.Χ. Τα πρώτα τυριά ήταν ξινά και αλμυρά και έχουν

παρόμοια υφή με το τυρί «cottage» ή τη σημερινή «φέτα» . Στην Ύστερη Εποχή του Χαλκού Μινωική - Μυκηναϊκή Κρήτη, οι πλάκες Γραμμικής γραφής Β καταγράφουν την απογραφή του τυριού.

Στην Αίγυπτο και συγκεκριμένα στην «Πόλη των νεκρών» στη Σακκάρα, το 2018 αρχαιολόγοι από το Πανεπιστήμιο του Καΐρου και το Πανεπιστήμιο της Κατάνια, ανακάλυψαν το παλαιότερο τυρί της Αιγύπτου και το οποίο εκτιμάται ότι είναι 3200 χρονών ( B.B.C., 2018). Επιπλέον, βρέθηκαν σε ένα τάφο λείψανα ενός επικήδειου γεύματος στα οποία βρέθηκε και τυρί, που χρονολογούνται από το 2900 π.Χ.. Τέλος, υπάρχουν και τοιχογραφίες σε αιγυπτιακό τάφο που απεικονίζουν την διαδικασία παραγωγής τυριού περίπου το 2000 π.Χ..

Στην αρχαία Ελληνική μυθολογία ο Αρίσταιος, γιός του θεού Απόλλωνα και της νύμφης Κυρίνης, ήταν αυτός που έδειξε στους Έλληνες τον τρόπο για την παραγωγή του τυριού. Ο Όμηρος στο έπος του «Οδύσσεια», τον 8ο αιώνα π.Χ. αναφέρει πως ο κύκλωπας, γνωστός και ως Πολύφημος, στην σπηλιά του αποθήκευε τυρί και έπηξε σε δοχεία αιγοπρόβειο γάλα για την παρασκευή του, συγκεκριμένα στην Ραψωδία Ι και στίχους 215 με 245 περιγράφει το εξής : « [...]Σε λίγο ομπρός στο σπήλιο φτάσαμε, μα μέσα αυτός δεν ήταν, μον' τα παχιά τ' αρνιά του εβόσκιζε ψηλά στα βοσκοτόπια. Κι εμείς το σπήλιο τριγυρίζοντας το αποθαμάξαμε, όλο τυριά γεμάτα τα τυρόβολα' στις μάντρες στοιβαγμένα [...] κι αυτός στο σπήλιο το πλατύχωρο τα ζωντανά του μπάζει, όλα όσα θα 'ρμεγε [...] Κι ως τις αρνάδες πήρε κι άρμεξε και τις βελάστρες γίδες... Μισό απ' το γάλα το άσπρο βάλθηκε μετά γοργά να πήξει, κι όπως το μάζωξε, το απίθωσε στα τυροβόλια μέσα' το άλλο μισό σε κάδους το 'βαλε να το 'χει για την ώρα που θα δειπνούσε, με το χέρι του ν' απλώνει και να πίνει [...] ».

Στην ρωμαϊκή εποχή η τυροκομία βρισκόταν στο απόγειο της δόξας της και πέρασε από το παρασκήνιο στο προσκήνιο (The Nibble, 2005). Η περίοδος αυτή έθεσε τα θεμέλια για την ανάπτυξη της τυροκομίας όπως την ξέρουμε σήμερα. Ήταν η ρωμαϊκή κουλτούρα που ανέπτυξε την τέχνη της τυροκομίας όπως τη γνωρίζουμε σήμερα. Οι Ρωμαίοι τυροκόμοι ήταν ειδικευμένοι τεχνίτες και ο ρωμαϊκός πολιτισμός ανέπτυξε πολλές ποικιλίες τυριών που μοιάζουν με αυτές που απολαμβάνουμε σήμερα. Οι Ρωμαίοι εφάρμοσαν για πρώτη φορά την παλαίωση του τυριού και την αποθήκευση του. Γνώριζαν τις επιπτώσεις των διαφόρων τεχνικών ωρίμανσης στη γεύση και στο χαρακτήρα ενός συγκεκριμένου τυριού. Είναι πιθανό ότι οι Ρωμαίοι να έφεραν μαζί τους το τυρί και την τέχνη της τυροκομίας, καθώς κατέλαβαν την Γαλατία, την σημερινή Γαλλία και Αγγλία, όπου αγκαλιάστηκε με ενθουσιασμό. Οι πρόγονοι των σημερινών Γάλλων τυροκόμων, τελειοποίησαν την τέχνη της παλαίωσης του τυριού, η οποία σήμερα είναι γνωστή με τον γαλλικό όρο «l'affinage». Τα μεγαλύτερα ρωμαϊκά σπίτια είχαν μια ξεχωριστή κουζίνα τυριού, την «caseale», και ειδικά δωμάτια όπου τα τυριά μπορούσαν να ωριμάσουν. Σε μεγαλύτερες πόλεις, τα τυριά που φτιάχνονταν σε οικιακό επίπεδο, μπορούσαν να μεταφερθούν σε ένα ειδικό κέντρο για να καπνιστούν. Μέχρι το 300 μ.Χ., το τυρί εξάγονταν τακτικά από τη Ρώμη σε χώρες κατά μήκος της Μεσογείου. Το εμπόριο είχε αναπτυχθεί σε τέτοιο βαθμό που ο αυτοκράτορας Διοκλητιανός έπρεπε να καθορίσει τις μέγιστες τιμές για μια σειρά τυριών, συμπεριλαμβανομένου ενός τυριού καπνιστού με μήλο, που ήταν πολύ δημοφιλές στους Ρωμαίους. Ένα άλλο τυρί, σφραγίστηκε και πωλήθηκε με την επωνυμία La Luna, πιθανώς ο πρόδρομος του σημερινού Parmigiano-Romano , το όνομα του οποίου εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1579. Όπως και άλλοι τομείς της γνώσης, η

τεχνογνωσία της Ρωμαϊκής τυροκομίας εξαπλώθηκε με την αυτοκρατορία τους σε όλη την Ευρώπη. Ρωμαίοι στρατιώτες που είχαν ολοκληρώσει τη στρατιωτική τους θητεία και παντρεύτηκαν με τον τοπικό πληθυσμό, δημιούργησαν αποικίες, όπου «πάντρεψαν» τις δικές τους γνώσεις στην τυροκομία με τις ήδη υπάρχουσες τοπικές γνώσεις. Με την κατάρρευση της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας γύρω στο 410, η τυροκομία εξαπλώθηκε αργά μέσω της Μεσογείου, του Αιγαίου και της Αδριατικής θάλασσας στη Νότια και Κεντρική Ευρώπη. Αντιθέτως, οι κοιλάδες των ποταμών παρείχαν εύκολη πρόσβαση και οι μέθοδοι που υιοθετήθηκαν για την παραγωγή προσαρμόστηκαν για να ταιριάζουν στις διαφορετικές εκτάσεις και τις κλιματολογικές συνθήκες. Οι αίγες και τα πρόβατα παρείχαν άφθονο γάλα για την τυροκομική δραστηριότητα των περιοχών αυτών. Σώζονται μέχρι σήμερα χειρόγραφες σημειώσεις της εποχής εκείνης με ακριβής περιγραφή της διαδικασίας τυροκόμησης διαφόρων τυριών. Πιο συγκεκριμένα, ο Lucius Junius Moderatus Columella στο έργο του « De Re Rustica » (Columella, 65 μ.Χ.) περιγράφει μια διαδικασία παρασκευής τυριών, που περιλαμβάνει την πήξη τους με πυτιά, την συμπίεση του τυροπήγματος, την αλάτιση και την παλαιώσή τους, ο Gaius Plinius Secundus , γνωστός και ως « Πλίνιος ο πρεσβύτερος », στο έργο του « Naturalis Historia » αφιερώνει δύο κεφάλαια (XI, 96-97) στις ποικιλίες τυριών που απολάμβαναν οι Ρωμαίοι της αυτοκρατορίας και αναφέρεται σε δύο ονόματα τυριών, το «Lozère» και το «Génaudan», της περιοχής Νίμ ( περιοχή της νότιας Γαλλίας) που για να τα απολαύσει κανείς έπρεπε να τα δοκιμάσει φρέσκα ( Gaius Plinius Secundus, 77 μ.Χ.).

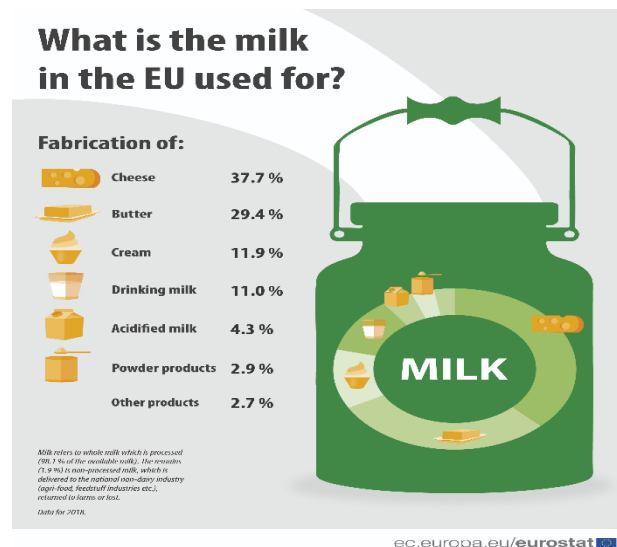
Η μετά την ρωμαϊκή αυτοκρατορία εποχή, όπου το εμπόριο μεταξύ των χώρων γινόταν με δυσκολία, και μέχρι τα τέλη του μεσαίωνα αποτελεί μία μαύρη σελίδα στην ιστορία της τυροκομίας, καθώς το τυρί θεωρήθηκε ακατάλληλο να βρίσκεται στο τραπέζι των «ευγενών» , ακόμη κατηγορήθηκε ότι είναι επιβλαβές για την υγεία των ανθρώπων. Στο μεσαίωνα, αυτοί που κράτησαν αναμμένη την «αφλόγα» της ελπίδας για την τυροκομία ήταν οι μοναχοί (The Nibble, 2005). Αυτοί εξέλιξαν την τυροκομία και άφησαν ως κληρονομιά πολλά από τα μέχρι σήμερα γνωστά τυριά. Στα τέλη του μεσαίωνα καταγράφηκαν τα περισσότερα τυριά, όπως το Τσένταρ καταγράφηκε γύρω στο 1500 μ.Χ., η Παρμεζάνα δημιουργήθηκε το 1597, η Γκούντα το 1697 και το Καμαμπέρ το 1791. Καθώς το εμπόριο μεγάλων αποστάσεων σταμάτησε, μόνο οι ταξιδιώτες μπορούσαν να έρθουν σε επαφή με μέρη με «άγνωστα τυριά». Αυτό οδήγησε επίσης σε ποικιλία τύπων τυριών. Σήμερα, η Βρετανία διαθέτει 15 προστατευμένης ονομασίας προέλευσης (ΠΟΠ), η Γαλλία έχει 50 ΠΟΠ τυριά, η Ιταλία 46 και η Ισπανία 26. Η Γαλλία, επίσης, διαθέτει τουλάχιστον 1.800 τυριά από νωπό γάλα και πιθανώς περισσότερα από 2.000 όταν συμπεριλαμβάνονται και τα τυριά από παστεριωμένο γάλα.

Μέχρι πριν την ανακάλυψη του «Νέου Κόσμου», το τυρί παρέμενε γνωστό μόνο στην Ευρώπη στην Μικρά Ασία και στη βόρεια Αφρική. Με την έναρξη των εξερευνητικών ταξιδιών και την δημιουργία των αποικιών, η τυροκομία έγινε γνωστή και στον υπόλοιπο κόσμο. Ωστόσο, στην Αμερική, κάποιοι από τους κατακτητές είχαν αναφέρει ότι ήδη οι Ίνκας και οι φυλές των Άνδεων παρασκεύαζαν τυρί από το γάλα των λάμα. Παρόλα αυτά, κάποιες έρευνες απέτυχαν να αποδείξουν την ορθότητα της αναφοράς αυτής (Gade Daniel W., 1999). Επόμενο ήταν λοιπόν, τα διάφορα είδη τυριών να γίνουν γνωστά και στον «Νέο Κόσμο», όπου η τυροκομία διατηρήθηκε σε οικιακό επίπεδο μέχρι το 1860. Αν και το πρώτο εργοστάσιο παραγωγής τυριού φτιάχτηκε στην Ελβετία το 1815, στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής ήταν που η παραγωγή για πρώτη φορά έγινε σε μεγάλη κλίμακα επιτυχώς. Ήταν το 1851 όταν ο Τζέσι Γουίλιαμς, ένας παραγωγός γαλακτος, έφτιαξε το πρώτο εργοστάσιο με ολοκληρωμένη γραμμή

παραγωγής, από την παραλαβή της πρώτης ύλης από φάρμες της περιοχής, μέχρι και την τυποποίηση του τελικού προϊόντος (Thom Charles, 1918). Μέσα στις επόμενες δεκαετίες, δημιουργήθηκαν εκατοντάδες γαλακτοκομικές ενώσεις. Η μαζική παραγωγή τυριού ξεκίνησε το 1860, και μέχρι να αλλάξει ο αιώνας οι επιστήμονες είχαν καταφέρει να παράγουν καθαρές μικροβιακές καλλιέργειες για την χρήση τους στην τυροκομία. Αυτό αποτέλεσε μεγάλο πλεονέκτημα της μοντέρνας τυροκομίας έναντι της παραδοσιακής, καθώς η παραγωγή καθαρών καλλιεργειών σήμαινε σταθεροποίηση της ποιότητας και τυποποίηση του παραγόμενου τυριού, αντίθετα στην παραδοσιακή τυροκόμηση οι καλλιέργειες προέρχονταν από βακτήρια του περιβάλλοντος ή από την ανακύκλωση παλαιού ορού γάλακτος. Έτσι, η μαζική παραγωγή του τυριού το έκανε άμεσα διαθέσιμο και στις οικονομικά δυσμενέστερες τάξεις. Στην αύξηση της δημοτικότητας του τυριού συντέλεσε και η ανάπτυξη συσκευασιών συντήρησής του, μέχρι την είσοδο του ψυγείου στην καθημερινή ζωή το 1913. Κατά την εποχή του Β' Παγκόσμιου Πολέμου το εργοστασιακά παραγόμενο τυρί αντικατέστησε σε μεγάλο βαθμό το παραδοσιακά παραγόμενο. Από τότε και μέχρι σήμερα τα εργοστάσια αποτελούν την κύρια πηγή διοχέτευσης των τυριών στη αγορά τόσο της Αμερικής, όσο και της Ευρώπης.

## 1.2 Η ΕΛΛΑΔΑ ΣΤΟ ΧΑΡΤΗ ΤΗΣ ΤΥΡΟΚΟΜΙΑΣ

Τα κράτη μέλη της ΕΕ χρησιμοποίησαν 17,4 εκατομμύρια τόνους αποβουτυρωμένου γάλακτος μαζί με 58,1 εκατομμύρια τόνους πλήρους γάλακτος για την παραγωγή 10,2 εκατομμυρίων τόνων τυριού το 2017. Πάνω από το 90% του τυριού παρήχθη από αγνό αγελαδινό γάλα, με 2% από αγνό πρόβειο ή αγνό αίγιο γάλα. Το φρέσκο τυρί αντιπροσώπευε το μεγαλύτερο μερίδιο της συνολικής παραγωγής τυριών στην ΕΕ (34%, ή 3,5 εκατομμύρια τόνοι τυριού), ακολουθούμενο από το ημίσκληρο τυρί (26%, ή 2,7 εκατομμύρια τόνους) και το σκληρό τυρί (19%, ή 1,9 εκατομμύρια τόνους). Μεταξύ των κρατών μελών της ΕΕ, η Γερμανία παρήγαγε τη μεγαλύτερη ποσότητα τυριού (2,2 εκατομμύρια τόνοι, ή το 22% του συνόλου της ΕΕ), ακολουθούμενη από τη Γαλλία (1,9 εκατομμύρια τόνους, ή 19%) και την Ιταλία (1,3 εκατομμύρια τόνους ή 12%), ενώ η



Εικόνα 1.1: Χρήση του γάλακτος στην ΕΕ (adapted from: Eurostat, 2018)

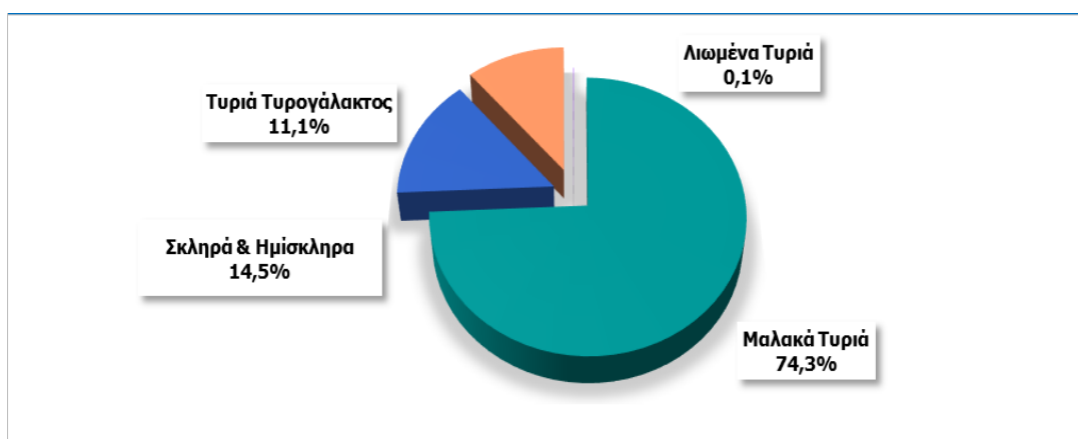


Ελλάδα παρήγαγε το 2% ( Eurostat, 2017). Η Γερμανία, η Γαλλία, η Ιταλία, η Ολλανδία και η Πολωνία παρήγαγαν μαζί το 70% του συνόλου των τυριών που παράγονται στην ΕΕ.

Στην Ελλάδα, από τα αρχαία χρόνια οι άνθρωποι ασχολούνταν με την τυροκομική. Στη σημερινή εποχή ο κλάδος των τυροκομικών προϊόντων συμβάλει κατά πολύ στην ανάπτυξη της οικονομίας καθώς απασχολεί μεγάλο αριθμό εργαζομένων στην επαρχία αλλά και τα αστικά κέντρα. Τα ελληνικά τυριά, όπως η φέτα, είναι εξαιρετικά δημοφιλή στο εσωτερικό της χώρας αλλά και στο εξωτερικό. Η κτηνοτροφία και η τυροκομία αποτελούν παραδοσιακά στοιχεία του τόπου μας. Ήδη από τα αρχαία χρόνια υπάρχουν αναφορές για την παραγωγή διαφόρων τύπων τυριών. Το τυρί αποτελεί βασικό είδος διατροφής για τους Έλληνες. Το πιο δημοφιλές είναι το τυρί «ΦΕΤΑ».

Στην Ελλάδα, η τυροκομία αποτελεί παραδοσιακό τομέα δραστηριότητας, καθώς η ενασχόληση των κατοίκων της με την παραγωγή τυριών αναφέρεται από πολλές ιστορικές πηγές ως μια από τις βασικότερες βιοτεχνικές δραστηριότητες στο πέρασμα των αιώνων. Με την πάροδο των χρόνων ο κλάδος σημείωσε σημαντική ανάπτυξη με ταυτόχρονη αύξηση του βαθμού βιομηχανοποίησης, αποτελώντας δυναμική συνιστώσα του κλάδου των γαλακτοκομικών και γενικότερα του τομέα των ειδών διατροφής (Icar, 2009). Οι μεγάλοι μεγέθους παραγωγικές μονάδες καλύπτουν σημαντικό μέρος της εγχώριας αγοράς (κατανάλωσης). Πρόκειται για μονάδες οι οποίες διαθέτουν σύγχρονο μηχανολογικό εξοπλισμό τον οποίο ανανεώνουν διαθέτοντας σημαντικά κονδύλια για επενδύσεις. Επίσης, μέσω διαφόρων μεθόδων προώθησης που εφαρμόζουν και του οργανωμένου και ευρύτατου δικτύου διανομής τους, έχουν κατορθώσει να καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της ελληνικής επικράτειας, ενώ αρκετές έχουν και εξαγωγική δραστηριότητα. Σημειώνεται ότι, οι μεγάλες επιχειρήσεις ακολουθούν στην παραγωγική τους διαδικασία σύγχρονα πρότυπα διασφάλισης ποιότητας (HACCP, ISO) (ICAP, 2009).

Η εγχώρια παραγωγή τυριών στο σύνολό της παρουσιάζει αύξηση , π.χ. το 2017 σε σύγκριση με 2016 η αύξηση ήταν της τάξης του 1,7%, ενώ το 2018 παρατηρήθηκε αύξηση με ρυθμό περίπου 2,4%. Την πλειονότητα των τυροκομικών προϊόντων αποτελούν τα μαλακά τυριά, καθώς το 2017 αποτελούσαν το 74% την συνολικής τυροκομικής παραγωγής από τις βιομηχανικές επιχειρήσεις. Η «ΦΕΤΑ», όπως είναι αναμενόμενο, κατέχει το μεγαλύτερο μέρος της κατηγορίας των μαλακών τυριών. Τα σκληρά και ημίσκληρα τυριά κατέχουν τη δεύτερη θέση με 14,5% το 2017. Ακολουθεί η κατηγορία των τυριών τυρογάλακτος με 11,1% και τελευταία η κατηγορία των τυριών κρέμας με 0,1% της εγχώριας παραγωγής για το ίδιο έτος. Στην χώρα μας το μεγαλύτερο μερίδιο της κατανάλωσης τυριών εξυπηρετείται από τα ελληνικής παραγωγής τυριά σε ποσοστό 60% περίπου έναντι του 40% από άλλα τυριά διαφορετικής προέλευσης. Η φέτα, ο τελεμές και τα μαλακά τυριά καλύπτουν το μεγαλύτερο ποσοστό κατανάλωσης τόσο των ελληνικών τυριών όσο και το σύνολο των τυροκομικών. Το 2017 περίπου το 13% της συνολικής εγχώριας κατανάλωσης αφορούσε τυποποιημένα τυροκομικά προϊόντα. ( ICAP 2019 ).

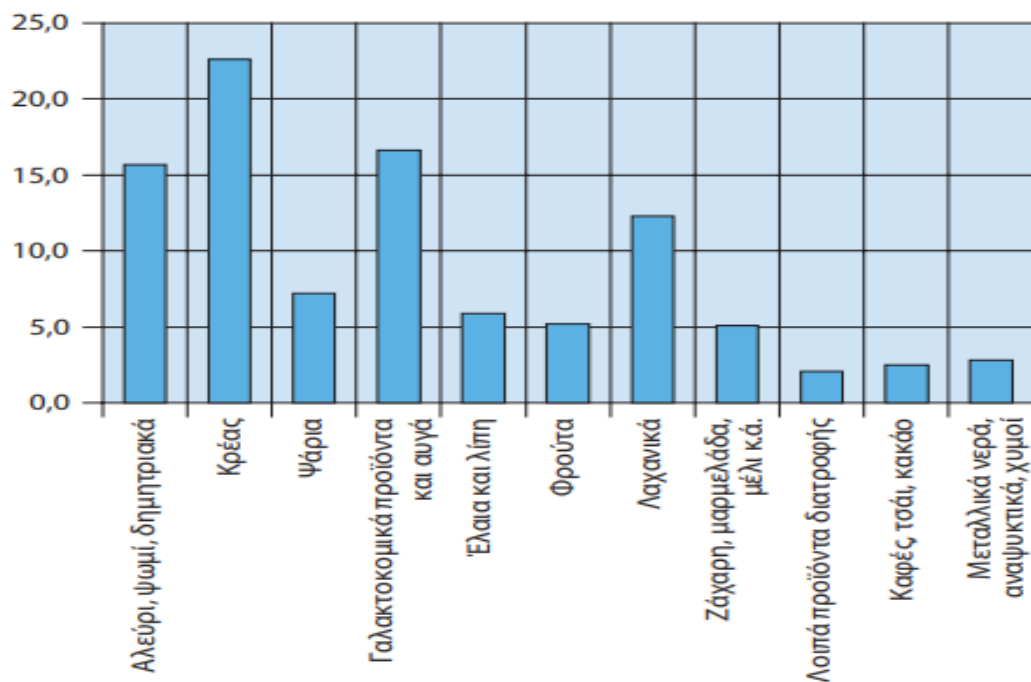


**Εικόνα 1.2: Η εγχώρια παραγωγή τυριών ανά κατηγορία προϊόντων για το έτος 2017 ( adapted from: ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ, Επεξεργασία στοιχείων ICAP )**

Σημειώνεται ότι η Ελλάδα από 1996 μέχρι σήμερα έχει καταφέρει να κατοχυρώσει 20 ελληνικά τυριά με προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (ΠΟΠ)(πίνακας 1.1) με κανονισμό της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (EC, IP/96/492). Η παραγωγή τυριών Π.Ο.Π. από βιομηχανικές επιχειρήσεις το 2017 έφτασε να αποτελεί το 63% της συνολικής παραγωγής. Στην Ελλάδα, το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής τυριών προορίζεται για την εγχώρια κατανάλωση (84% το 1996), όπου τα παραδοσιακά τυριά αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της, σε αντίθεση με τα τυριά εισαγωγής που αποτελούν το 23% περίπου αυτής. Η μέση μηνιαία δαπάνη των ελληνικών νοικοκυριών για γαλακτοκομικά προϊόντα κυμαίνεται στο 16% (εικόνα 1.3). Η κατανάλωση χύμα τυριών προτιμάται από το μεγαλύτερο κομμάτι, προς το παρόν, των Ελλήνων καταναλωτών, ωστόσο ο αριθμός τους μειώνεται σταδιακά, εξαιτίας της προτίμησης τυποποιημένων προϊόντων.

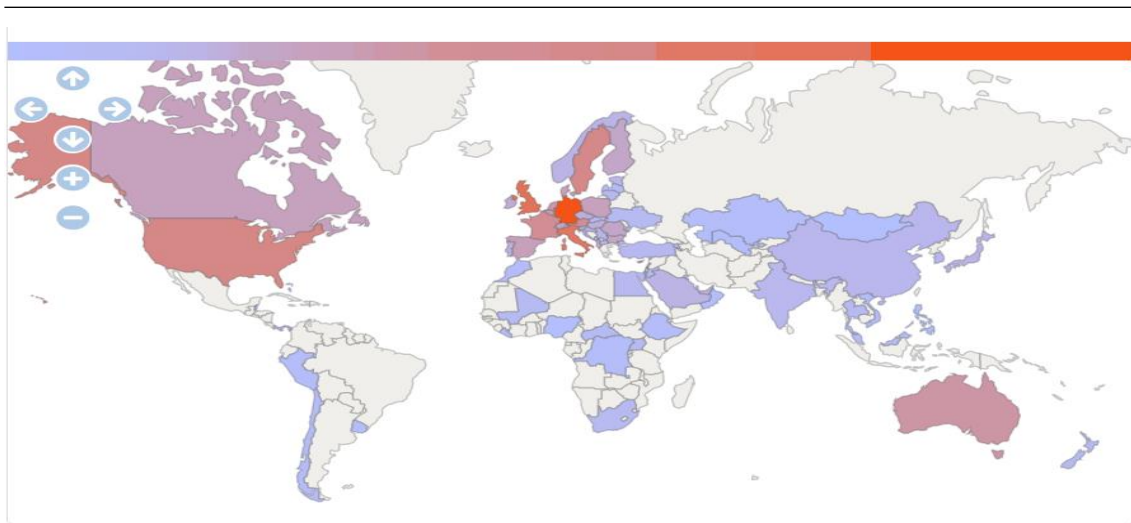
**Πίνακας 1.1: Ελληνικά Τυριά ΠΟΠ**

Ανεβατό	Γαλοτύρι	Γραβιέρα Αγράφων	Γραβιέρα Κρήτης
Γραβιέρα Νάξου	Καλαθάκι Λήμνου	Κασσέρι	Κατίκι Δομοκού
Κοπανιστή	Λαδοτύρι Μυτιλήνης	Κεφαλογραβιέρα	Μανούρι
Μετσοβόνε	Μπατζός	Ξινομυζήθρα Κρήτης	Πηχτόγαλο Χανίων
Σαν Μιχάλη	Σφέλα	Φέτα	Φορμαέλλα Αράχωβας Παρνασσού



Εικόνα 1.3: Η μέση μηνιαία δαπάνη (%) των νοικοκυριών για είδη διατροφής, 2017 ( adapted from: ΕΛΣΤΑΤ)

Όσα από τα ελληνικά τυριά προωθούνται για εξαγωγή, το μεγαλύτερο μέρος τους διοχετεύεται στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, και κυρίως στη Γερμανία. Συγκεκριμένα, η αξία των ελληνικών εξαγωγών στη κατηγορία «τυρί και γιαούρτι» την περίοδο 2019, απέδωσε κέρδη της τάξης των 520 εκατ. δολαρίων, με την γερμανική αγορά να έχει απορροφήσει το 30% των ελληνικών εξαγωγών του συνόλου των τυριών, ακολουθεί το Ηνωμένο Βασίλειο με 13.2%, η Ιταλία με 11.2%, οι Ηνωμένες Πολιτείες με 5.94%, η Αυστραλία με 2.88%, ενώ, στη Γαλλία και στην Αυστρία εξάχθηκε από 4% αντιστοίχως (TrendEconomy: Merchandise Exports by Country (HS02), 2020) (Εικόνα 1.4). Οι βαλκανικές χώρες, ήδη από το 1999 (Πατσής et al., 1999) παρουσιάζουν μία αυξανόμενη ζήτηση στα ελληνικά τυριά, αν και βρίσκεται σε χαμηλά ακόμη επίπεδα, σε σχέση με άλλες χώρες. Έξι χώρες, επί της ουσίας, η Γερμανία, η ΗΠΑ, η Αυστραλία, η Αυστρία, η Ιταλία, και η Γαλλία, απορροφούν το 95% του συνόλου των εξαγωγών των παραδοσιακών ελληνικών τυριών. Μεταξύ αυτών των χωρών, η Γερμανία κατέχει εξέχουσα θέση με σημαντική επιρροή στην πορεία των ελληνικών εξαγωγών.



Εικόνα 1.4: Χώρες εξαγωγής των ελληνικών τυριών την χρονική περίοδο 2019. Η χρωματική κλίμακα υποδεικνύει το ποσοστό διάθεσης των ελληνικών τυριών σε κάθε χώρα. ( adapted from: Trend Economy: Merchandise Exports by Country (HS02) 2020)

### 1.3 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ & ΓΑΛΑΚΤΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα παίζουν σημαντικό ρόλο στην διατροφή του ανθρώπου. Η ιστορία τους ξεκινάει πολλά χρόνια πριν από την εποχή της εξημέρωσης των ζώων. Το γάλα αποτελεί την πρώτη πηγή τροφής του βρέφους και είναι ικανή να καλύψει πλήρως τις διατροφικές του ανάγκες σε αυτή την ευαίσθητη και κρίσιμη περίοδο της ζωής του. (Μάντης 2000, Κεχαγιάς, 2011)

Ο άνθρωπος περιλαμβάνει το γάλα και τα προϊόντα του όπως γιαούρτι, τυρί, ξινόγαλο στην καθημερινή του διατροφή, γιατί του εξασφαλίζουν τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία όπως λίπος, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και βιταμίνες. Επίσης περιέχουν και μεγάλη ποσότητα ασβεστίου και φωσφόρου, που είναι αρκετά σημαντική για την δημιουργία του μυοσκελετικού συστήματος. Συμβάλουν στην διατήρηση της συστολικής πίεσης σε φυσιολογικά επίπεδα και μειώνουν τις πιθανότητες εμφάνισης διαβήτη τύπου II και άλλα (Μάντης, 2000; Κεχαγιάς, 2011).

### 1.4 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

#### 1.4.1 ΑΓΕΛΛΑΙΝΟ ΓΑΛΑ

Η ελληνική νομοθεσία ορίζει ως «γάλα» το προϊόν που εκκρίνεται από τους μαστικούς αδένες γαλακτοφόρου ζώου, όπως οι αγελάδες, τα πρόβατα, οι αίγες ή τα βουβάλια, το οποίο δεν θερμαίνεται πέραν των 40°C, ή/και δεν υποβάλλεται σε επεξεργασία με παρόμοιο αποτέλεσμα. Είναι προϊόν πλήρως απαλλαγμένο πρωτογάλακτος, με

ολοσχερούς, χωρίς διακοπή, άλμεξης υγιούς ζώου, το οποίο ζει και τρέφεται υπό υγιείς συνθήκες και δεν βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης. Με τον όρο «γάλα» θεωρούμε το γάλα που προέρχεται από τις αγελάδες (KTM,2009 άρθρο 80).

Το γάλα από διαφορετικά είδη ζώων, που επιλέγεται για προϊόν κατανάλωσης, περιέχει σχεδόν τα ίδια συστατικά, με μικρές ποσοτικές διακυμάνσεις σε κάθε περίπτωση. Η φυλή, η ηλικία και η υγεία του ζώου, η περίοδος γαλακτοπαραγωγής, ο αριθμός των αλμέξεων, οι κλιματικές συνθήκες κ.α. αποτελούν κάποιες από τις περιπτώσεις που μπορούν να δημιουργήσουν αλλαγές στα βασικά συστατικά του γάλακτος. Ως βασικά συστατικά ορίζονται η λακτόζη, οι πρωτεΐνες και το λίπος. Το γάλα περιέχει επίσης πολλά συστατικά που συμβάλλουν στην καλύτερη διατροφή του καταναλωτή, όπως βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, άλατα, ένζυμα, ορμόνες και αντιμικροβιακές ουσίες. Όσον αφορά το χρώμα του γάλακτος, είναι λευκό έως ελαφρά κίτρινο. Αυτή η χρωματική ποικιλία οφείλεται στο είδος του ζώου, τη φυλή και στην διατροφή του. Η οσμή του είναι ιδιάζουσα, ενώ η γεύση του θεωρείται ευχάριστη, ελαφρώς υπόγλυκη, λόγω της λακτόζης (Κεχαγιάς, 2011).

Στην συνέχεια αναφέρονται ενδεικτικά η περιεκτικότητα των κύριων συστατικών του γάλακτος: 85-87% νερό, λίπος(σε μορφή λιποσφαιρίων, που αποτελούνται κυρίως από τριγλυκερίδια περιεκτικότητας 2.5-6%), ακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το λινελαϊκό και το λινολενικό οξύ, που είναι απαραίτητα για τον ανθρώπινο οργανισμό, 2.8% καζεΐνη (φωσφοροπρωτεΐνες, που συμβάλουν στην οξύνιση του γάλακτος σε pH 4.6 και θερμοκρασία 20°C), 0.6% πρωτεΐνες ορού, 4.9% λακτόζη καθώς και 0.7% ανόργανα άλατα (Μάντης, 2000).

Το γάλα θεωρείται ένα τρόφιμο υψηλής διατροφικής αξίας λόγω του ασβεστίου, του φωσφόρου, των βιταμινών και των πρωτεϊνών υψηλής διατροφικής αξίας που περιέχει. Πρόκειται για μία σημαντική πηγή βιταμινών A,B1,B2, νιασίνη και παντοθενικού οξέος (Μάντης, 2000).

#### **1.4.2 ΠΡΟΒΕΙΟ ΓΑΛΑ**

Όλα τα γάλατα περιέχουν τα ίδια συστατικά σε διαφορετικές αναλογίες. Το πρόβειο γάλα περιέχει πολύ περισσότερο λίπος και πρωτεΐνες από το αγελαδινό και της αίγας. Έχει σχεδόν διπλάσια ποσότητα λίπους από ότι περιέχει το αγελαδινό γάλα. Στην αυξημένη περιεκτικότητα σε λιπαρά οφείλεται η μοναδική του γεύση και το άρωμα των προϊόντων του, όπως τυριά, γιαούρτι και άλλα. Το λευκό χρώμα του πρόβειου γάλακτος οφείλεται στη μη απορρόφηση των καροτινοειδών από το λίπος, ανεξάρτητα από την τροφή που λαμβάνουν τα ζώα (χλωρή τροφή ή όχι), ενώ, το κίτρινο χρώμα του αγελαδινού γάλακτος, οφείλεται στην παρουσία της καροτίνης (Μάντης, 2000; Κεχαγιάς, 2011).

#### **1.4.3 ΑΙΓΕΙΟ ΓΑΛΑ**

Στην χημική σύνθεση του αίγειου γάλακτος παρουσιάζονται διαφορές στα αμινοξέα των καζεϊνών σε σύγκριση με τα αντίστοιχα του αγελαδινού. Η σύσταση του λίπους του αίγειου είναι η τυπική του γάλακτος των μηρυκαστικών, ωστόσο η περιεκτικότητά σε αυτό είναι μεγαλύτερη σε σχέση με το αγελαδινό και μικρότερη σε σχέση με το πρόβειο. Τα υπόλοιπα στερεά συστατικά είναι παρόμοια. Τέλος η πρωτεΐνες του ορού του είναι

πιο ευαίσθητες σε υψηλές θερμοκρασίες σε σχέση με τις αντίστοιχες του αγελαδινού (Μάντης,2000). Για την βιομηχανία γάλακτος, έχουν μεγάλη σημασία δύο χαρακτηριστικά του λίπους του. Πρώτων το μικρότερο μέγεθος των λιποσφαιρινών σε σχέση με το αγελαδινό, που δυσκολεύει την βιομηχανική αφαίρεση της κρέμας από το αίγιο γάλα. Αυτό συμβαίνει γιατί και στα δύο αυτά γάλατα το μέγεθος των λιποσφαιρινών είναι από 1μm έως 10μm. Όμως η αναλογία των λυποσφαιρινών που έχουν μέγεθος μικρότερο από 5μm είναι 60% στο αγελαδινό και σχεδόν 80% στο αίγιο. Δεύτερων η σύσταση των λιπαρών οξέων στο αίγιο γάλα έχει μεγαλύτερη αναλογία λιπαρών οξέων μεσαίας αλύσου όπως το καπροϊκό, το καπρυλικό και το κοπρικό. Σε αυτά οφείλεται η χαρακτηριστική οσμή του αίγιου άλακτος (Κεχαγιάς,2011).

Τα προϊόντα από αίγιο γάλα χαρακτηρίζονται ως υψηλής διατροφικής αξίας, λόγω της ειδικής σύνθεσής του. Έχει λιγότερη περιεκτικότητα σε λακτόζη, περισσότερη ινοσιτόλη και διαφορετική δομή γαλακτοαλβουμίνης που το κάνει πιο εύπεπτο και προτείνεται σε άτομα που έχουν δυσανεξία στο αγελαδινό γάλα ή στο γάλα σόγιας. Επίσης περιέχει μικρό αριθμό αλλεργιογόνων. Για τον λόγο αυτό, συνιστάται σε άτομα που εμφανίζουν διαφόρων ειδών αλλεργιών. Επίσης είναι ιδιαίτερα ευεργετικό σε περιπτώσεις σιδηροπενίας(Bellioni-Businco et al., 1999). Το αίγιο γάλα είναι τροφή υψηλής διατροφικής αξίας που περιέχει υψηλότερες συγκεντρώσεις βιταμινών Α,Β,Β1,Β2,С και νικοτινικού οξέος σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα (Pandya and Ghodke, 2007).

## **1.5 ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ**

### **1.5.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ**

Το Τυροκομείο του Ιδρύματος Τοσίτσα στο Μέτσοβο άρχισε να λειτουργεί το 1958. Το όραμα του Ευάγγελου Αβέρωφ- Τοσίτσα ήταν να λειτουργήσει ένα τυροκομείο που θα είχε τη μορφή μιας πρακτικής σχολής. Ένα υπόδειγμα προς μίμηση για τους τυροκόμους της περιοχής. Ο Ε. Αβέρωφ συνέβαλε ώστε ορισμένοι νεαροί Μετσοβίτες να πάνε για τυροκομικές σπουδές στην Ιταλία. Η επιλογή των νεαρών δεν ήταν τυχαία, αποτελούσαν γόνους οικογενειών κτηνοτρόφων, οι οποίοι τυροκομούσαν με τον μέχρι τότε γνωστό παραδοσιακό τρόπο. Οι θεωρητικές γνώσεις που απέκτησαν, σε γνωστές τυροκομικές σχολές της βορείου Ιταλίας, μαζί με τις εμπειρίες που είχαν από παιδιά, συνετέλεσαν στο να γίνουν ολοκληρωμένοι τυροκόμοι. Ένας από αυτούς ήταν και ο Μετσοβίτης Απόστολος Μπίσας, που αποτέλεσε πολύ σημαντική προσωπικότητα για το τυροκομείο του ιδρύματος. Οι τυροκόμοι, κατάφεραν να « παντρέψουν » τον τρόπο κατασκευής ορισμένων ιταλικών τυριών με τον αντίστοιχο παραδοσιακό ελληνικό τρόπο, επιλέγοντας τους τύπους των σκληρών τυριών, που οι απαιτήσεις τους ταιριάζουν με το παραγόμενο γάλα στην περιοχή Μετσόβου. Έτσι « γεννήθηκε » το «*ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ*» από το αντίστοιχο «Προβολόνη» της Ιταλίας.

### 1.5.2 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΟ ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ;

Σύμφωνα με την απόφαση 313070/18.1.1994 του Υφυπουργού Γεωργίας (ΦΕΚ 23/Β/18.1.94, 101/Β/16.2.1994) η ονομασία «ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ» (METSOVONE) αναγνωρίζεται ως «προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π) για το τυρί που παράγεται παραδοσιακά στην περιοχή της επαρχίας Μετσόβου του Νομού Ιωαννίνων από γάλα αγελαδινό ή μίγμα αυτού με πρόβειο και γίδινο, τα οποία τελευταία δεν υπερβαίνουν το 20% συνολικά κατά βάρος». Το γάλα παρασκευής του «ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ» προέρχεται αποκλειστικά από την περιοχή αυτή, καθώς και από ζώα φυλών προσαρμοσμένων στην περιοχή, που διατρέφονται από την τοπική χλωρίδα της περιοχής.

### 1.5.3 ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ

Τα βασικά χαρακτηριστικά του τυριού «ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ» ( ποιοτικά, οργανοληπτικά, γευσιογνωστικά κλπ) είναι:

- Χημική σύσταση:
  - Μέγιστη υγρασία: 38% κατά βάρος
  - Λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού: 40% κατά βάρος
- Τύπος τυριού:
  - Συνεκτικότητα: ημίσκληρο έως σκληρό με συμπαγή μάζα
  - Σχήμα: κυλινδρικό
  - Βάρη τυριού: 1.5Kg, 2.5Kg, 4.5Kg περίπου
- Επιδερμίδα: λεπτή, ξηρή, κίτρινη έως καστανόχρους
- Μάζα τυριού:
  - Υφή: ημίσκληρη έως σκληρή
  - Χρώμα: αχυρόχρουν
- Άλλα κύρια χαρακτηριστικά: επιτραπέζιο καπνιστό τυρί, με κυλινδρικό σχήμα και ελαφρά αλμυρή και πικάντικη γεύση

### 1.5.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ

1. Παραλαβή γάλακτος: Το γάλα που παραλαμβάνεται προς τυροκόμηση, προέρχεται από ζώα, στα οποία έχει επέλθει διάστημα 10 ημερών από τον τοκετό. Απαγορεύεται στο προς τυροκόμηση γάλα συμπύκνωση, η προσθήκη σκόνης ή

συμπυκνώματος γάλακτος, πρωτεϊνών γάλακτος, καζεϊνικών αλάτων, χρωστικών, συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών.

2. Φιλτράρισμα: Στο στάδιο αυτό το γάλα θερμαίνεται και περνάει μέσα από τον κορυφολόγο, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν ύπαρξη ξένων σωμάτων.

3. Παστερίωση: Το γάλα υπόκειται σε βραδεία παστερίωση στους 67°C για 17 λεπτά

4. Πήξη της τυρόμαζας: πριν από την πήξη γίνεται η προσθήκη τυρογάλακτος της προηγούμενης ημέρας (βιολογικά οξυνισμένο τυρόγαλα), με οξύτητα 0,30-0,35 SH σε αναλογία 3%-4%, ως πηγή αβλαβών οξυγαλακτικών βακτηρίων. Η πήξη γίνεται εντός 48 ωρών από την άλμεξη και στους 32- 35°C εντός 10-15 λεπτών.

5. Διαίρεση τυροπήγματος: Ακολουθεί η διαίρεση του δημιουργούμενου τυροπήγματος και αναθέρμανσή του στους 46-48°C για 15-20 λεπτά. Στη συνέχεια, εξαγωγή, στράγγιση και ωρίμανσή του σε ξύλινο κάδο, μέχρι οξύνισής του με PH 5,3-5,1.

6. Σχηματισμός τυροπήγματος: Η οξυνισμένη τυρομάζα τεμαχίζεται σε λωρίδες και μεταφέρεται σε νερό θερμοκρασίας 70-80°C, όπου μετατρέπεται σε λεία και εύπλαστη μάζα που τοποθετείται σε καλούπια κυλινδρικού σχήματος και εν ακολοιυθία σε κρύο νερό, ώσπου να αποκτήσουν σταθερό σχήμα.

7. Αλάτιση: Το αλάτισμα επιτυγχάνεται ύστερα από εμβάπτιση του τυριού σε άλμη συγκέντρωσης 18-20 Be. Η διάρκεια παραμονής του τυριού στην άλμη είναι ανάλογη του βάρους του σε ημέρες.

8. Ωρίμανση: προηγείται καθαρισμός, δέσιμο με σπάγκο κάθε τυριού ξεχωριστά. Η ωρίμανση πραγματοποιείται σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο, ώστε η θερμοκρασία να κυμαίνεται στους 15-17°C και σχετική υγρασία 35%. Η ωρίμανση διαρκεί τουλάχιστον 3 μήνες.

9. Κάπνιση: Η κάπνιση γίνεται με φυσικό καπνό από φυτά της περιοχής ( 90% άχυρο) και διαρκεί 3-4 ώρες, ωστόσο μπορεί να παραμείνει στο καπνιστήριο ακόμα και για 24 ώρες.

10. Παραφίνωση

11. Διάθεση του προϊόντος για ανθρώπινη κατανάλωση



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup> : ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

### 2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

Η ετυμολογία της λέξης «μυκοτοξίνη» προέρχεται από την ελληνική «μύκης» και την λατινική «toxicum», που σημαίνουν μύκητας και δηλητήριο αντίστοιχα. Ο όρος μυκοτοξίνη, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για την περιγραφή της αιτίας της ασθένειας, γνωστή ως ασθένεια Χ των γαλοπούλων, που έπληξε το Λονδίνο το 1960, όπου προκάλεσε το θάνατο σε περίπου 100.000 γαλοπούλες. Το αίτιο ήταν στην διατροφή των πτηνών, όπου εμπεριέχονταν μολυσμένες αραχίδες με τους δευτερογενείς μεταβολίτες του *Aspergillus flavus*, τις αφλατοξίνες (Blout, 1961). Όλες οι μυκοτοξίνες αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των νηματοειδών μυκήτων (Benett and Klich, 2003). Έχουν αναγνωριστεί περίπου 300-400 μυκοτοξίνες με διαφορετική δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες εκ των οποίων ένα μικρό κομμάτι τους, από τις διαφορετικές ομάδες, είναι επιβλαβές για την υγεία του ανθρώπου και των ζώων (Benett and Klich, 2003; Cole and Cox, 1981). Ως μυκοτοξίνες θεωρούνται οι μικρού μοριακού βάρους παραγόμενοι μεταβολίτες των μυκήτων, που μπορούν να προκαλέσουν τοξίνωση σε μικρές συγκεντρώσεις, διαχωρίζοντάς τους από άλλες μικρού μοριακού βάρους παραγόμενες ουσίες που προκαλούν τοξίνωση σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Bennett, 1987).

Οι μυκοτοξίνες ανήκουν στις μικρού μοριακού βάρους τοξίνες, οι οποίες παράγονται αποκλειστικά από μύκητες, και έχουν χαρακτηριστική ποικιλομορφία στην δομή τους, η οποία δυσκολεύει πολύ την ομαδοποίησή και ταυτοποίησή τους, καθώς μπορεί να είναι από πολύ απλές μέχρι πολύ σύνθετες δομές. Αυτές παράγονται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας, ωστόσο αν και αποτελούν δευτερογενούς μεταβολίτες των μυκήτων, δεν έχει αποδειχθεί να φέρουν κανένα σημαντικό ρόλο για την ανάπτυξη αυτών. Η έκθεση του ανθρώπου στις μυκοτοξίνες μπορεί να γίνει είτε μέσω κατανάλωσης τροφίμων φυτικής προέλευσης ή ζωικής προέλευσης προϊόντων (CAST, 2003), είτε μέσω του αέρα και της σκόνης όταν περιέχουν τοξίνες (Jarvis, 2002). Επίσης, οι τοξικογενείς μύκητες είναι γνωστό ότι παράγουν μία ή περισσότερες μυκοτοξίνες, παρ' όλα αυτά, δεν είναι όλοι οι μύκητες τοξικογενείς ή δεν είναι όλοι οι δευτερογενείς μεταβολίτες τους τοξικοί. Επομένως, οι μυκοτοξίνες δεν είναι μόνο δύσκολο να προσδιοριστούν αλλά είναι δύσκολο και να ταξινομηθούν. Αυτό αποδίδεται στην ποικίλη χημική τους δομή, στην παραγωγή τους από πέραν του ενός είδους μύκητα, όπως προαναφέρθηκε και στην πολυποίκιλη βιολογική τους επίδραση στους οργανισμούς. Οι κλινικοί τις κατατάσσουν ανάλογα με το όργανο στο οποίο δρουν (πχ. νευροτοξίνες, ηπατοτοξίνες, νεφροτοξίνες κτλ.) ή με βάση την ασθένεια που προκαλούν. Οι χημικοί τις κατατάσσουν με βάση την χημική τους δομή (πχ. λακτόνες, κουμαρίνες), οι βιοχημικοί με βάση την βιοσύνθεσή τους, οι βιολόγοι με βάση την δράση τους στα κύτταρα (τερατογόνες, μεταλλαξιογόνες, καρκινογόνες, αλλεργιογόνες), ενώ οι μυκητιολόγοι με βάση των μύκητα προέλευσης. Ωστόσο, καμία από αυτές τις ταξινομήσεις δεν είναι επαρκής (Bennett and Klich, 2003).

Οι μυκοτοξίνες και ιδίως οι αφλατοξίνες (AF), οι ωχρατοξίνες (OT), οι τριχοθεσίνες, η ζεαραλενόνη (ZEN), οι φουμονισίνες (F) και μερικοί άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες αποτελούν μεγάλης αγροοικονομικής και δημόσιας υγειονομικής σημασίας, καθώς

δαπανούνται μεγάλα χρηματικά ποσά κάθε χρόνο για την διασφάλιση τόσο της ανθρώπινης υγείας όσο και της υγείας των ζώων. Αντιθέτως, υπάρχει μεγάλη ζημία λόγω των απορριφθέντων, μολυσμένων, προϊόντων. Σε έρευνα που διεξήχθη στις ΗΠΑ εκτιμήθηκε ότι η απώλεια, λόγω τριών μυκοτοξινών (αφλατοξίνη, φουμονεσίνη, δεοξυνιβαλενόλη), σε καλαμπόκι, σιτάρι και φιστίκια, ανέρχεται περίπου στο ποσό του 1 δισεκατομμυρίου δολαρίων (Vardon et al., 2003).

Τα τρόφιμα τα οποία προσβάλλονται συνήθως είναι το καλαμπόκι, το σιτάρι, τα δημητριακά, το ρύζι, ο καφές, η σόγια, καρποί όπως φιστίκια, αμύγδαλα, φουντούκια. Επίσης εντοπίζονται σε αποξηραμένα φρούτα και χυμούς των, στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα, στις σταφίδες και στο κρασί. Αν και στα περισσότερα από αυτά τα προϊόντα μπορεί να προηγηθεί κάποια επεξεργασία με αποτέλεσμα την θανάτωση των μυκήτων, η συγκέντρωση ωστόσο των μυκοτοξινών μπορεί να παραμείνει αμετάβλητη και να παραμείνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα δραστικές. Αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο γεγονός ότι οι μυκοτοξίνες είναι θερμοάντοχες ενώσεις, ως συνέπεια δεν καταστρέφονται κατά την θερμική επεξεργασία, ακόμη και κατά την παστερίωση υψηλής θερμοκρασίας (UHT), αλλά ούτε και με την κατάψυξη των προϊόντων.

## **2.2 ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ**

Για να κατανοηθεί ο τρόπος με τον οποίο οι μυκοτοξίνες παράγονται από τους μύκητες πρέπει πρώτα να κατανοηθεί ο τρόπος ανάπτυξης των μυκήτων ο οποίος θα έχει και σαν αποτέλεσμα την παραγωγή τους.

Οι μύκητες είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι ευκαριωτικοί οργανισμοί, οι οποίοι αναπτύσσουν μία παρασιτική σχέση με τον ξενιστή τους ή διαβιούν ως σαπρόφυτα και φέρουν χαρακτηριστικό σχηματισμό το μυκητήλλιο ή μυκήλιο. Αναπαράγονται είτε αγενώς ή εγγενώς, όπου δημιουργούνται σπόρια ή κονίδια, τα οποία κάτω από ευνοϊκές συνθήκες περιβάλλοντος εκβλαστάνουν και επέρχεται επέκταση των υφών και τελικά τον σχηματισμό του μυκηλίου ( Μπερζιρτζόγλου, 2005).

Διάφοροι παράγοντες ευνοούν την ανάπτυξη των μυκήτων και ως συνέπεια και των μυκοτοξινών. Παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το υπόστρωμα, το pH, η ενεργότητα ύδατος (aw), η σχετική υγρασία, το διαθέσιμο οξυγόνο, το φως και διάρκεια του, οι καλλιεργητικές τεχνικές (χρήση εντομοκτόνων και μυκητιοκτόνων) και η ύπαρξη ή μη ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας. Όλοι αυτοί οι παράγοντες ασκούν διαφορετική δράση στην ανάπτυξη των μυκήτων και είναι άμεσα συνδεδεμένοι με το γένος και το είδος τους, ενώ υπάρχουν και διαφορές ακόμα και σε στελέχη του ίδιου γένους (Fitendorg et al., 1996; Popovki and Celar, 2013).

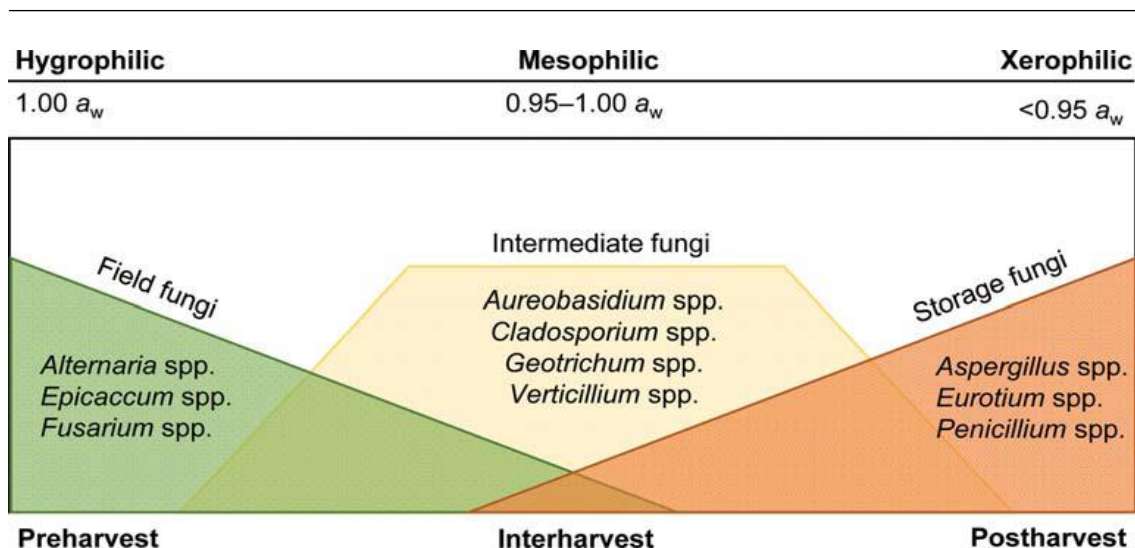
### **2.2.1 ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΑ ΦΥΤΑ**

Δύο είναι οι βασικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι μύκητες που απαντώνται στις αγροτικές καλλιέργειες, οι προ- και οι μετά- συγκομιδής. Αυτοί που ανήκουν στην

προ-συγκομιδής είναι μύκητες, κυρίως του γένους *Fusarium* spp, που προσβάλλουν τα φυτά και παράγουν τις μυκοτοξίνες πριν την συγκομιδή (π.χ. φουμονισίνες, αφλατοξίνη). Αυτοί που ανήκουν στην μετά-συγκομιδή είναι μύκητες, κυρίως, των γενών *Aspergillus* spp. και *Penicillium* spp, που προσβάλλουν τα φυτά και παράγουν τις μυκοτοξίνες μετά την συγκομιδή κατά την φάση της αποθήκευσης (π.χ. ωχρατοξίνη). Ωστόσο το γένος *Aspergillus* spp. αποτελεί μια ιδιαίτερη περίπτωση, καθώς ενώ ανήκει στη δεύτερη κατηγορία, μπορεί να παράγει μεγάλες συγκεντρώσεις μυκοτοξινών (αφλατοξίνες) σε καρπούς και πριν την συγκομιδή τους (Osweiler, 1999; Taylor, 1999). Επίσης, έχει γίνει ταυτοποίηση τεσσάρων τύπων τοξικογενών μυκήτων. Ο πρώτος τύπος αφορά τους φυτοπαθολόγους (π.χ. *f. graminearum*), ο δεύτερος τους μύκητες που παράγουν τοξίνες σε φυτά, τα οποία είτε βρίσκονται κάτω υπό στρεσογόνες συνθήκες, είτε είναι υπέρωριμα (π.χ. *f. verticillioides*, *a. flavus*, *a.c arbonarius*), ο τρίτος αυτού που αποικίζουν το φυτό, αλλά η παραγωγή των μυκοτοξινών γίνεται μετά την συγκομιδή (π.χ. *a. flavus* στον αραβόσιτο). Ο τέταρτος τύπος αφορά μύκητες που προέρχονται από υλικά του εδάφους ή έχουν αποικίσει μέρη του φυτού και αναπτύσσονται κατά την αποθήκευση των καρπών κάτω από ευνοϊκές συνθήκες (π.χ. *penicillium verrucosum* στα σιτηρά και *a.flavus* στους καρπούς) (Miller, 1995; Miller, 2008; Binder et al., 2007).

Οι μύκητες που προαναφέρθηκαν, χρειάζονται συγκεκριμένες συνθήκες περιβάλλοντος για να επέρθει η ανάπτυξή τους και κατά επέκταση η παραγωγή μυκοτοξινών. Αν και οι παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν, αναφέρθηκαν προηγουμένως, θα ήταν σημαντική παράληψη να μην τους αναλύσουμε περισσότερο, καθώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ή όχι των μυκοτοξινών. Έτσι, οι πρώτοι δύο παράγοντες είναι η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία. Οι προαναφερόμενοι μύκητες αναπτύσσονται σε εύκρατα, τροπικά, ημιτροπικά κλίματα και σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, που κυμαίνεται από 10°C έως 35°C, ενώ η σχετική υγρασία πρέπει να είναι ίση ή και μεγαλύτερη του 75% (Kuhn and Ghannoum, 2003; Xu et al., 2007). Για παράδειγμα, το γένος *Fusarium* spp. αναπτύσσεται σε σχετική υγρασία μεγαλύτερη του 70%. Η παραγωγή της μυκοτοξίνης σε σχέση με την φάση ανάπτυξης του μύκητα, δηλαδή αν η παραγωγή λαμβάνει χώρα στην λογαριθμική ή στη στατική φάση, παραμένει αδιευκρίνιστη. Ωστόσο, είναι βέβαιο ότι γίνεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες από την βέλτιστη. Στον *A.flavus*, για παράδειγμα, η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 37°C , ενώ η αφλατοξίνη παράγεται στους 28°C με 30°C (Sanchis and Magan, 2004).

Η ενεργότητα του ύδατος ( $a_w$ ), εκφράζει το μη δεσμευμένο νερό ή το νερό που είναι διαθέσιμο για τους μικροοργανισμούς, παίρνει τιμές από το 0 μέχρι το 1 και μεταβάλλεται ανάλογα την θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι περισσότεροι μύκητες αναπτύσσονται σε  $a_w=0,86$  (Magan et al., 2010; Mousa et al., 2011), ενώ ξεχωριστή περίπτωση αποτελεί ο *Aspergillus flavus* του γένους *Aspergillus* spp, ο οποίος αναπτύσσεται σε χαμηλές τιμές,  $a_w=0,73$ , ενώ παράγει την αφλατοξίνη σε  $a_w=0,85$  (Sanchis and Magan, 2004; Μπαλατσούρας, 2006). Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται τα εξής: Εικόνα 2.1, γίνεται κατάταξη των μυκήτων με βάση το στάδιο εμφάνισης και κυριαρχίας τους, πριν και μετά την συγκομιδή των καλλιεργειών, και με την  $a_w$  που απαιτείται και στην Εικόνα 2.2 , παρουσιάζονται ορισμένα είδη μυκήτων, καθώς και η ελάχιστη και βέλτιστη θερμοκρασία και ενεργότητα ύδατος για την ανάπτυξη των μυκήτων και την παραγωγή των μυκοτοξινών τους.



Εικόνα 2.1: Κατάταξη των μυκήτων στο στάδιο εμφάνισης και κυριαρχίας τους, πριν και μετά την συγκομιδή των καλλιεργειών. Η πάνω οριζόντια κλίμακα αντιπροσωπεύει την εναλλακτική ταξινόμηση των μυκήτων στους σπόρους με βάση την ανάγκη τους σε ενεργότητα ύδατος ( $a_w$ ) για να αναπτυχθούν (adapted from: Mohamed Manna & Ki Deok Kim, 2017)

Fungi	Toxin	Fungal growth/mycotoxin production			
		Minimum $T_m$ (°C)	Optimum $T_m$ (°C)	Minimum $a_w$	Optimum $a_w$
<i>Alternaria alternata</i>	Alternuene, alternariol, alternariol monomethyl ether	–	21/25	0.88/0.88–0.89	0.982/>0.97
<i>Alternaria alternata</i>	Tenuazonic acid	–	21/20	0.88/0.90–0.93	0.982/>0.97
<i>Alternaria tenuissima</i>	Tenuazonic acid	10/10	20/20	0.85/0.85	1.00/1.00
<i>Aspergillus amstelodami</i>	Sterigmatocystin	6/–	–	0.70/–	–
<i>Aspergillus candidus</i>	Kojic acid	10/–	–	0.75/–	–
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Ochratoxin A	8/–	35/25–30	0.80/0.83–0.87	0.93–0.987/0.98
<i>Aspergillus chevalieri</i>	Gliotoxin, xanthocillin, sterigmatocystin	10/–	–	0.71/–	–
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxin	–/8	35/28	0.78–0.84/0.84	0.95/0.99
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumigillin, gliotoxin	12/–	–	0.82/–	–
<i>Aspergillus nidulans</i>	Kojic acid, sterigmatocystin	12/–	–	0.83/–	–
<i>Aspergillus niger</i>	Oxalic acid	12/–	35/–	0.85/–	0.99/–
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ochratoxin A	–	30/25–30	0.77/0.83–0.87	0.96–0.98/0.98
<i>Aspergillus oryzae</i>	Kojic acid, oryzacin	–	–	0.86/–	–
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxin	–	35/33	0.81–0.82/–	0.95/0.99
<i>Aspergillus versicolor</i>	Sterigmatocystin	6/–	–	0.83/–	–
<i>Cladosporium herbarum</i>	Epicladosporic acid	–/7/–	–	0.88/–	–
<i>Fusarium graminearum</i>	Zearalenone	–	–/25–30	–/0.90–0.91	–/0.98
<i>Fusarium</i> spp.	Fumonisin	4/10	30/15–30	0.90/0.93	–
<i>Fusarium</i> spp.	Deoxynivalenol	5–10/11	20–25/29–30	0.90–0.91/0.90	0.98–0.99/0.99
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Ochratoxin A	–	–	0.82–0.85/0.87–0.90	–
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Mycophenolic acid	–/2/–	–	0.81/–	–
<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinin	12/–	–	0.80/–	–
<i>Penicillium clavatus</i>	Patulin	12/–	–	–	–/0.99
<i>Penicillium expansum</i>	Patulin	0/1–4	–	0.82–0.85/–	–/0.99
<i>Penicillium islandicum</i>	Islanditoxin, luteoskyrin	10/–	–	0.83/–	–
<i>Penicillium patulum</i>	Patulin	4/–	–	0.81/–	–/0.95
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ochratoxin A	0/–	–/25	0.80–0.81/0.83–0.85	0.95/0.90–0.95
<i>Stachybotrys atra</i>	Stachybotryotoxins	2/–	–	0.94/–	–

Εικόνα 2.2: Ελάχιστη και βέλτιστη θερμοκρασία (°C) και ενεργότητα ύδατος ( $a_w$ ) για την ανάπτυξη των μυκήτων και την παραγωγή των μυκοτοξινών (adapted from: Mohamed Manna & Ki Deok Kim, 2017)

Σημαντικός παράγοντας είναι επίσης και το υπόστρωμα πάνω στο οποίο αναπτύσσονται οι μύκητες. Τα ιδανικά υποστρώματα που μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξή τους είναι αυτά που μπορούν να προσφέρουν πολλούς υδατάνθρακες, δεξτρόζη, ξυλόζη, καθώς και να είναι πλούσια σε νιτρικά και νιτρώδη. Τέτοια υποστρώματα είναι τα περισσότερα φυτικής προέλευσης προϊόντα και τρόφιμα (π.χ. ξηροί καρποί, σιτηρά, φρούτα κ.α.)

Αντίθετα, οι συνύπαρξη και άλλων μικροβίων στο περιβάλλον των μυκήτων μπορεί να αποτελέσει σημαντικό εμπόδιο στην ανάπτυξη τους. Μικροοργανισμοί όπως ο *Bacillus subtilis*, τα διάφορα είδη του *Lactobacilli* και της *Pseudomonas*, οι *Ralstonia* spp και οι *Burkholderia* spp έχουν ανταγωνιστική δράση στην ανάπτυξή τους και στις μυκοτοξίνες (Yin et al., 2008; Kumar et al., 2017). Παρόμοιο τρόπο δράσης έχουν και μερικά είδη ζυμών (*Debaryomyces* και *Candida* spp) (Virgili et al., 2012).

Η εποχή του χρόνου και η γεωγραφική κατανομή των μυκήτων διαδραματίζει, επίσης, ρόλο στην παραγωγή των μυκοτοξινών. Ωστόσο, λόγω των έντονων κλιματολογικών μεταβολών που συμβαίνουν τα τελευταία χρόνια, την διευκόλυνση του εμπορίου δημητριακών καρπών και την μεταφορά τους σε μεγάλες αποστάσεις έχει μεταβληθεί η γεωγραφική κατανομή των μυκήτων, με αποτέλεσμα περιοχές που μέχρι πρότινος θεωρούνταν χαμηλού κινδύνου, θα μετατραπούν σε υψηλού κινδύνου για την παραγωγή κάποιων μυκοτοξινών (R.R.M. Paterson, 2010; Osweiler, 1999; WHO-FAO, 2001; Richard et al., 2007).

Έτσι όλο αυτοί οι παράγοντες απαιτούνται για την ανάπτυξη των μυκήτων, από την ύπαρξη του ιδανικού υποστρώματος, στην ύπαρξη ευνοϊκού συνδυασμού υγρασίας, θερμοκρασίας και ενεργότητας ύδατος, μέχρι και την συνύπαρξη τους με άλλους μικροοργανισμούς και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση. (Wilson and Abramson, 1992; Αλεξόπουλος, 1997; Xuet al., 2007). Σημαντικό επίσης είναι και ο χρόνος έκθεσης του προϊόντος στις δυσμενείς συνθήκες, υπό τις οποίες ευνοείται η ανάπτυξη των μυκήτων στα προϊόντα (Belli et al., 2004; Mitchell et al., 2004; Belli et al., 2005). Τέτοιες συνθήκες μπορούν να αποτελέσουν διάφοροι παράγοντες που καταπονούν τα φυτά, όπως υψηλή θερμοκρασία, μεγάλης διάρκειας ξηρασία, καταστροφή τους από μηχανικά μέσα στη φάση της συγκομιδής και αποθήκευσης ή/και έντομα που καταστρέφουν το προστατευτικό μέρος το φυτού, και εν τέλει θα συμβάλουν στην ανάπτυξη τοξικογενών μυκήτων στα υπό καλλιέργεια φυτά και κατ' επέκταση παραγωγή μυκοτοξινών (Richard and Cole, 1989; Omniski et al., 1994).

Ωστόσο, υπάρχουν και μύκητες που έχουν συμβιωτική σχέση με τα φυτά, οι οποίοι παράγουν ενώσεις, που συνδράμουν στην ανάπτυξη του φυτού, καθώς μπορεί να του προσδίδουν ανθεκτικότητα σε κάποια έντομα, ανοχή σε ακραίες μεταβολές θερμοκρασίας και ξηρασίας (Joost, 1995).

Συνεπώς, ο προσδιορισμός όλων των προδιαθετικών παραγόντων που συμβάλουν στην παραγωγή μυκοτοξινών και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση, συμβάλει στην ορθότερη εφαρμογή μεθόδων πρόληψης, για τον σκοπό αυτό πολλές μελέτες έχουν στραφεί προς αυτή την κατεύθυνση (Suarez-Quiroz et al., 2004; Astoreca et al., 2007).

## 2.2.2 ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΙΣ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ

Τα τελευταία χρόνια η κτηνοτροφία οδεύει στην πλήρη εντατικοποίησή της, προκείμενου να αυξηθούν οι αποδόσεις και να μεγιστοποιηθεί το κέρδος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την δραματική αλλαγή της διατροφής του ζωικού κεφαλαίου. Αν ωστόσο, αναλογιστούμε ότι το ¼ των παραγόμενων δημητριακών σε ετήσια βάση επιμολύνεται με μυκοτοξίνες (στοιχεία FAO, 2013), σε συνδυασμό της συμβολής των κλιματικών αλλαγών στον επιπολασμό της μόλυνσης από μυκοτοξίνες, γίνεται φανερό η σημασία της λήψης μέριμνας για να αποτραπεί η επιμόλυνση των ζωοτροφών.

Τα γένη των μυκήτων που ευθύνονται για τις παραγόμενες μυκοτοξίνες είναι οι *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*. Το χαρακτηριστικό των ουσιών αυτών είναι ότι έχουν υψηλή ανθεκτικότητα στην μηχανική καταπόνηση και στις συνθήκες αποθήκευσης. Γεγονός που επιφέρει μεγάλη οικονομική απώλεια στον κτηνοτροφικό κλάδο και κατ' επέκταση στην στηριζόμενη σε αυτόν βιομηχανία. Οι τοξίνες που απομονώνονται σε μεγαλύτερη συχνότητα είναι οι αφλατοξίνες, οι φουμονισίνες, η ωχρατοξίνη Α, οι τριχοθεσίνες και η ζεαραλενόνη. Αυτές ανευρίσκονται σε δημητριακούς καρπούς, όπως καλαμπόκι και κριθάρι, στη σόγια, στη βρώμη, στον βαμβακόσπορο κ.α., συνήθως πριν την συγκομιδή. Έτσι με το πέρασ της συγκομιδής, θα αποτελέσουν την δομή των ζωοτροφών είτε σε μορφή ενσιρώματος, είτε σε ακατέργαστη μορφή. Επομένως, η όποια ανάπτυξη των παραπάνω μυκήτων και η παραγωγή των αντίστοιχων μυκοτοξινών, θέτουν σε κίνδυνο τόσο την δημόσια υγεία μέσω των παραγόμενων, ζωικής προελεύσεως, διατροφικών προϊόντων, όσο και των ίδιων των ζώων.

Για να μπορέσουμε να περιορίσουμε όσο είναι δυνατόν την πιθανότητα της ανάπτυξης των μυκήτων, θα πρέπει η όλη διαδικασία της ξήρανσης των καρπών που προορίζονται για ζωοτροφές, αλλά και στις διαδικασίες επεξεργασίας και συσκευασίας τους, πριν αποθηκευτούν, να γίνεται με τέτοιο τρόπο, ώστε να εξασφαλίζονται οι κατάλληλες συνθήκες υγρασίας για τη μη ανάπτυξή τους. Επίσης, κατά την αποθήκευση να επικρατούν χαμηλά ποσοστά υγρασίας και χαμηλή τιμή θερμοκρασίας για την αποφυγή επιπρόσθετης μόλυνσης (Bhat et al., 2010). Παραδείγματος χάρη, η συγκομιδή του αραβόσιτου πραγματοποιείται όταν τα επίπεδα υγρασίας του καρπού είναι 20%-22%, διότι τότε εξασφαλίζεται η καλύτερη ποιότητα, επίπεδα που ευνοούν την ανάπτυξη του γένους *A.flavus* (βέλτιστη υγρασία 18%, αναπτύσσεται και σε ποσοστό υγρασίας 13%). Ακολουθεί ξήρανση του καρπού, πριν αυτός αποθηκευτεί, με τέτοιο τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται το μικρότερο δυνατό ποσοστό υγρασίας για την αποφυγή ανάπτυξης του μύκητα και την παραγωγή μυκοτοξινών (Marin et al., 2012). Τα γένη *aspergillus* και *penicillium* μπορούν να αναπτύσσονται σε συνθήκες χαμηλότερης ενεργότητας ύδατος και υψηλότερης θερμοκρασίας σε σχέση με το γένος *fusarium*, που αναπτύσσεται σε υψηλότερες τιμές ενεργότητας ύδατος και χαμηλότερη θερμοκρασία.

Λόγω του διεθνούς εμπορίου και της ανάπτυξης και διευκόλυνσής του, γίνεται διακίνηση ζωοτροφών σε μεγάλες αποστάσεις. Συνεπώς, απαιτείται η αποθήκευσή τους για μεγάλο χρονικό διάστημα, με αποτέλεσμα την συμβολή στην διασπορά των μυκήτων. Δηλαδή, μεταφέρονται μύκητες από περιοχή σε περιοχή, που δεν ανευρίσκονταν μέχρι πρότινος ένα είδος μύκητα, οδηγώντας στην αύξηση του κινδύνου επιμόλυνσης με μυκοτοξίνες (Bhat et al., 2010; Afsah-Hejri et al., 2013).

## 2.3 Η ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

### 2.3.1 Η ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΩΝ ΖΩΩΝ

Τα περισσότερα συμπτώματα που οφείλονται σε μυκοτοξίνες, αφορούν κατανάλωση μολυσμένων δημητριακών καρπών και σπανιότερα με οποιαδήποτε άλλον τρόπο έκθεσής τους σε αυτές (π.χ. εισπνοή, μέσω δέρματος) (Osweiler, 1999; Richard 2007). Η ταυτόχρονη κατανάλωση περισσότερων της μίας τοξίνης και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση δεν έχει ερευνηθεί εκτενώς. Επίσης, η ένταση των συμπτωμάτων μπορεί να ποικίλει ανάλογα το είδος του ζώου, καθώς κάθε είδος εμφανίζει διαφορετική ευαισθησία. Η συνύπαρξη ορισμένων μυκοτοξινών είναι δυνατό να αυξήσει την τοξική τους επίπτωση, καθώς και την εμφάνιση αθροιστικής δράσης. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί αθροιστική δράση μεταξύ αφλατοξινών και ωχρατοξίνης, ύστερα από κατανάλωση τροφής στην οποία συνυπήρχαν (Huff et al., 1988; Harvey et al., 1989a). Επιπλέον, σε διάφορες έρευνες βρέθηκε ότι ιστοί που έφεραν τοξικογόνο μύκητα ήταν πιο τοξικοί από ιστούς στους οποίους είχε χορηγηθεί με έγχυση η αντίστοιχη ίση ποσότητα τοξίνης. Αυτό αποδόθηκε στο γεγονός ότι οι μύκητες παράγουν μαζί με την μυκοτοξίνη και μη τοξικούς δευτερογενείς μεταβολήτες που ενισχύουν την δράση της παραγόμενης τοξίνης. Πρόσφατες έρευνες υποδεικνύουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των μυκοτοξινών ως πολύ σημαντικότερη από την επίδραση των μυκοτοξινών μεμονωμένα (Diaz et al., 2011). Οι μυκοτοξίνες δρουν ως καρκινογόνα (π.χ. αφλατοξίνες, ωχρατοξίνη και φουμονεσίνη), άλλες ως μεταλλαξιογόνα-τερατογόνα (π.χ. αφλατοξίνες, ωχρατοξίνες), ως οιστρογόνες (ζεαραλενόνη). Άλλες προκαλούν αιμορραγίες (τριχοθυκένια), ή αποτελούν τοξικές για το ανοσοποιητικό σύστημα (αφλατοξίνες και ωχρατοξίνη), τον νεφρό (ωχρατοξίνη), το ήπαρ (αφλατοξίνες), το δέρμα (τριχοθυκένια) και το νευρικό σύστημα (εργοτοξίνες). Η εμφάνιση της επίπτωσης των μυκοτοξινών στην υγεία των ζώων εξαρτάται από την προσληφθείσα ποσότητα, την τοξικότητα των επιμέρους συστατικών (πρόκληση οξείας ή χρόνιας παθολογικής κατάστασης), το σωματικό βάρος, την ταυτόχρονη παρουσία και άλλων μυκοτοξινών (συνεργική δράση) και άλλων διατροφικών παραγόντων.

#### 2.3.1.1 ΠΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑ

Η αρνητική επίδραση των μυκοτοξινών στην αποδοτικότητα των πτηνών έχει αναφερθεί σε πολλές έρευνες (Mohamed E. Zain, 2010). Για παράδειγμα, όταν κοτόπουλα κρεατοπαραγωγικής κατεύθυνσης ταϊστήκαν με φύραμα που περιείχε υψηλά επίπεδα αφλατοξινών (79% AFB1, 16% AFG1, 4% AFB2, 1% AFG2), το σωματικό βάρος μειώθηκε σε αντίθεση με την αύξηση του βάρους του ήπατος και του σπλήνα (Smith et al., 1992). Οι αφλατοξίνες αυξάνουν επίσης και την συγκέντρωση του αζώτου-ουρίας και μειώνουν στον ορό τα επίπεδα των ολικών πρωτεϊνών, των αλβουμινών, των τριγλυκεριδίων, και του φωσφόρου. Επίσης, σε κοτόπουλα που διατράφηκαν με Ωχρατοξίνη-A (0,3-1 mg/Kg τροφής), μειώθηκε η γλυκογενόλυση, που οδήγησε σε δοσοεξαρτώμενη κινητοποίηση του γλυκογόνου στο ήπαρ. Αυτές οι αρνητικές μεταβολικές αποκρίσεις οδήγησαν στην μειωμένη αξιοποίηση της τροφής και σε τερατογόνες δυσμορφίες (Bitay et al., 1979). Οι μυκοτοξίνες του *Fusarium*, αποδείχτηκε

ότι έχουν δυσμενή επίδραση στα πτηνά. Επιπρόσθετα της μειωμένης πρόσληψης τροφής και της απόκτησης βάρους, προκλήθηκαν έλκη και πλάκες στην στοματική κοιλότητα και στον βλεννογόνο της, όταν χορηγήθηκε σε κοτόπουλα 7 ημερών η τοξίνη T-2 ( 4 ή 16 mg/Kg τροφής) ή DAS (4 ή 16 mg/Kg τροφής). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν επίσης σε νεοσσούς ηλικίας 1 ημέρας-3 εβδομάδων που κατανάλωναν τοξίνη T-2 σε 6 mg/Kg τροφής και σε όρνιθες ηλικίας 24-25 εβδομάδων που κατανάλωναν DAS στα 20 mg/Kg τροφής. Είναι ενδιαφέρον ότι η γονιμότητα αυξήθηκε στις όρνιθες (ηλικίας 67-69 εβδομάδων) και μειώθηκε στους αλέκτορες (ηλικίας 25-27 εβδομάδων), όταν η DAS τροφοδοτήθηκε στα 65 και 10 mg/kg τροφής αντίστοιχα (Brake et al., 2000).

### **2.3.1.2 ΧΟΙΡΟΤΡΟΦΙΑ**

Οι χοίροι είναι από τα πιο ευαίσθητα είδη στις μυκοτοξίνες. Η ανοσοαπόκριση των χοίρων στις αφλατοξίνες ποικίλει. Η χυμική ανοσολογική απόκριση των χοίρων δεν μεταβλήθηκε, ύστερα από χορήγηση φυράματος με αφλατοξίνη σε επίπεδα που κυμαίνονται από 0,4 με 0,8 mg/Kg τροφής, έως οξεία τοξικά επίπεδα τόσο υψηλά όσο 500 mg/Kg τροφής. Η ανοσοκαταστολή, που προκαλείται από τις αφλατοξίνες (140 ή 280 mg/Kg τροφής) εμφανίστηκε μόνο στην κυτταρική και όχι στη χυμική ανοσία, και στην αναστολή της σύνθεσης DNA σε λεμφοκύτταρα χοίρου όταν προστέθηκε AFB1 στο μέσο σε διάφορα επίπεδα (0,1-10 000 ng/ml μέσου) (Pang and Pan, 1994). Έχουν καταδειχθεί αρνητικές επιδράσεις της μυκοτοξίνης ζεαραλενόνης στην αναπαραγωγική λειτουργία των χοίρων (Diekman and Green, 1992). Οι οιστρογονικές επιδράσεις της ζεαραλενόνης έχουν έντονη και παρατεταμένη δράση στους χοίρους. Μια εκτεταμένη μελέτη σε συγγρικά αγροκτήματα, εμφανίστηκε οίδημα των αιδοϊκών και των μαστικών αδένων και περιστασιακά πρόπτωση του κόλπου και του απευθυσμένου σε σεξουαλικώς ώριμες χοιρομητέρες, που κατανάλωναν τροφές μολυσμένες με ζεαραλενόνη (Glavitis and Vanyi, 1995). Άλλες οιστρογονικές επιδράσεις της ζεαραλενόνης στις νεαρές χοιρομητέρες ή στις χοιρομητέρες περιλαμβάνουν οιδήματα της μήτρας, κύστεις των ωοθηκών, αυξημένη ωρίμανση των ωοθυλακίων και αριθμό θνησιγενών, και μειωμένο ποσοστό γονιμοποίησης. Στην ίδια μελέτη, η ζεαραλενόνη προκάλεσε εκφυλισμό του βλαστικού επιθηλίου και άλλαξε το σχηματισμό του σπέρματος στους αγριόχοιρους. Αναπαραγωγικές διαταραχές (π.χ. ατροφία των ωοθηκών και της μήτρας, εκφυλισμός των ωοθηκών και αδενική δυσλειτουργία του ενδομητρίου) έχουν επίσης αναφερθεί, όταν οι χοιρομητέρες εκτέθηκαν σε τροφές μολυσμένες με την τοξίνη τριχοθεσίνη (T-2). Σημάδια προγεννητικής τοξίκωσης με τριχοθεσίνες (T-2) (π.χ. αδενική δυσλειτουργία του ενδομητρίου, γαστρεντερικό οίδημα και αιματοποίηση που οδηγεί σε θάνατο) παρατηρήθηκαν επίσης σε γαλοχούμενα χοιρίδια (Hussein and Brasel, 2001).

### **2.3.1.3 ΒΟΟΤΡΟΦΙΑ, ΑΙΓΟΠΡΟΒΑΤΟΤΡΟΦΙΑ**

Τα μηρυκαστικά όπως τα βοοειδή, τα πρόβατα, οι αίγες και τα ελάφια είναι λιγότερο γνωστά για την ευαισθησία τους στις αρνητικές επιπτώσεις των μυκοτοξινών από ό, τι τα μη μηρυκαστικά. Ωστόσο, η παραγωγή (γάλα, βόειο κρέας ή μαλλί), η αναπαραγωγή και η ανάπτυξη μπορούν να αλλάξουν όταν τα μηρυκαστικά καταναλώνουν μολυσμένη



με μυκοτοξίνη τροφή για παρατεταμένες χρονικές περιόδους (Hussein and Brasel, 2001).

Σε μια μελέτη των Cook et al. (1986), χρησιμοποιήθηκε ραδιοτηλεμετρία για τη μέτρηση της κινητικότητας της μεγάλης κοιλίας στα βοοειδή και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση αφλατοξίνης (200-800  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) επιβραδύνει την κινητικότητα της κοιλίας με τρόπο που εξαρτάται από τη δόση (Cook et al., 1986). Οι ωχρατοξίνες, από την άλλη πλευρά, δεν προκαλούν σημαντική τοξικότητα στα βοοειδή, όταν τρέφονται μόνο τους σε φυσικές δόσεις. Κριθάρι, φυσικά μολυσμένο, με OTA (390–540  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) και με χαμηλά επίπεδα AFB1 (12–13  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) δεν προκάλεσαν σημαντικά κλινικά συμπτώματα σε μοσχάρια ηλικίας 12 εβδομάδων. Η απουσία τοξικής επίδρασης μπορεί να οφείλεται στη μικροβιακή αποικοδόμηση και αποτοξίνωση στη μεγάλη κοιλία (Patterson et al., 1981). Οι αφλατοξίνες επηρεάζουν επίσης την ποιότητα του γάλακτος που παράγεται από αγελάδες γαλακτοπαραγωγής και έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταφορά AFM1 σε αυτό από μολυσμένες με AF τροφές. Δέκα αγελάδες Holstein γαλουχίας έλαβαν AFB1 (13 mg ανά αγελάδα ημερησίως) μέσω του στομίου στην μεγάλη κοιλία για 7 ημέρες. Τα επίπεδα AFM1 στο γάλα των αγελάδων που υποβλήθηκαν σε αυτή την χορήγηση κυμαίνονταν από 1,05 έως 10,58 ng/L. Οι αγελάδες που είχαν υποστεί αγωγή με AFB1 είχαν επίσης σημαντική μείωση της γαλακτοπαραγωγικής απόδοσής τους. Ο ρυθμός μεταφοράς από την τροφή στο γάλα αποδείχθηκε υψηλότερος (6,2 έναντι 1,8) στην πρώιμη γαλουχία (2–4 εβδομάδες) σε σύγκριση με την όψιμη γαλουχία (34–36 εβδομάδες) (Veldman et al., 1992). Μια έρευνα σε βοοειδή γαλακτοπαραγωγής που τρέφονταν με μουχλιασμένο καλαμπόκι που περιείχε 1 mg/Kg τοξίνης T-2 οδήγησε σε αιμορραγικό σύνδρομο. Με εξαίρεση την τοξίνη T-2, τα βοοειδή δεν επηρεάστηκαν δυσμενώς από τις τριχοθεσίνες. Ούτε η DON ούτε η DAS είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την υγεία και την απόδοση των βοοειδών (Dicostanzo et al., 1996). Η ζεαρελενονή έχει προταθεί ως αιτιολογικός παράγοντας στειρότητας, μειωμένης παραγωγής γάλακτος και υπεροιστρογονισμού στα βοοειδή (D'Mello και MacDonald, 1997).

Τα πρόβατα σύμφωνα με έρευνες είναι τα πιο ανθεκτικά στις μυκοτοξίνες (Miller and Wilson, 1994). Ωστόσο, αρνάδες που ταΐστηκαν με τροφή μολυσμένη με αφλατοξίνες (2,5mg/Kg ή 5mg/Kg τροφής για 35 ημέρες) (AFB1 79%, AFG1 16%, AFB2 4%, AFG2 1%) εμφάνισαν ηπατοτοξικότητα (Harvey et al., 1995). Σε μία άλλη μελέτη (Fernandez et al., 1997), αμνοί ταΐστηκαν με αφλατοξίνες 2,5 mg/Kg τροφής ημερησίως για 21 ημέρες. Αυτοί εμφάνισαν συμπτώματα τοξίκωσης από αφλατοξίνες, όπως αλλοιώσεις στο ήπαρ και στους νεφρούς, μεταβολή του μεταβολισμού των μετάλλων και αύξηση του μεγέθους του ήπατος και των νεφρών. Σε άλλη έρευνα (Ramos et al., 1996) με την ίδια ημερήσια δόση σε αφλατοξίνες (2,5 mg/Kg τροφής) εξετάστηκε η συγκέντρωση των μετάλλων στο πλάσμα αίματος τις ημέρες 1,2,4 και 8 από την στιγμή της αρχικής δόσης. Την ημέρα 4 υπήρχε σημαντική μείωση του Ca, P, Mg, K, Zn. Η μείωση αυτή αποδόθηκε στην μειωμένη πρόληψη τροφής και στην δυσλειτουργία του ήπατος και των νεφρών ως αποτέλεσμα της τοξίκωσης από τις αφλατοξίνες. Οι μυκοτοξίνες από Fusaria σε υψηλές δόσεις φαίνεται επίσης να έχουν κάποιες αρνητικές επιπτώσεις στα πρόβατα. Η έκθεση των προβάτων σε DON (15,6 mg/Kg τροφής) για 28 ημέρες δεν είχε καμία επίδραση στη μέση ημερήσια αύξηση, στις παραμέτρους της αιμοκυτταρολογίας ή στη λειτουργία του ήπατος. Ωστόσο, η απώλεια βάρους αναφέρθηκε μετά από 34 ημέρες σίτισης με DAS (5 mg/Kg τροφής) σε αρνιά. Περαιτέρω απώλεια βάρους αναφέρθηκε επίσης σε 34 ημέρες σίτισης αρνιών με το ίδιο επίπεδο DAS σε συνδυασμό με AF (2,5 mg / kg τροφής) που υποδηλώνει συνεργική δράση (Harvey et al., 1995). Έχει προταθεί

ότι τα υψηλά επίπεδα διατροφής (12 mg/Kg τροφής) με ZEN για παρατεταμένες χρονικές περιόδους (10 ημέρες) μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την αναπαραγωγική απόδοση των προβάτων μειώνοντας τα ποσοστά γονιμότητας και ωορρηξίας (Dicostanzo et al., 1996). Οι φουμονισίνες σε υψηλές δόσεις (11,1-45,5 mg/Kg σωματικού βάρους) έχουν αποδειχθεί ότι προκαλούν οξεία και θανατηφόρα νεφροτοξική και ηπατοτοξική δράση στα αρνιά (Edrington et al., 1995). Πρέπει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι τέτοια πειραματικά επίπεδα δεν έχουν βρεθεί σε μολυσμένες με φουμονισίνες τροφές. Τα πρόβατα που έχουν επίσης επηρεαστεί από τοξίκωση από λόλιο, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τρόμο, μειωμένη παραγωγικότητα και, σε ορισμένες περιπτώσεις, θάνατο (D'Mello και MacDonald, 1997). Έχει παρατηρηθεί χρόνιο «τρίκλισμα» σε πρόβατα που καταναλώνουν λόλιο μολυσμένο με *A. lolii*. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν τρόμο, με απώλεια συντονισμού και την αδυναμία περπατήματος (Cheeke, 1998b). Το «τρίκλισμα» εμφανίζεται όταν το μολυσμένο από *A. lolii* λόλιο έχει την τοξίνη λολιτρέμη Β σε επίπεδα 2,0-2,5 mg/Kg (DiMenna et al., 1992).

### 2.3.2 Η ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Οι μυκοτοξίνες αποτελούσαν και αποτελούν κίνδυνο για την δημόσια υγεία εδώ και χιλιετίες. Για παράδειγμα, ο εργοτισμός, ή όπως είναι γνωστός και ως « Η φωτιά του Αγ. Αντώνιου», στην περίοδο του μεσαίωνα αποτέλεσε την αιτία για μαζικούς θανάτους στην Ευρώπη. Αποδείχθηκε ότι σχετίζονταν σε τοξίνες (π.χ. αλκαλοειδή του εργοτισμού) που παρήχθησαν από εργοτικούς μύκητες (*Claviceps purpurea*), οι οποίες είχαν ποικίλες τοξικές επιδράσεις τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα ( Agrios G., 2005). Το 1981, στην Ιαπωνία παρατηρήθηκε τοξικότητα των κόκκων ρυζιού μολυσμένων με μύκητα, αυτό αργότερα αναφέρθηκε ως «κίτρινο ρύζι». Ο όρος αυτός περιγράφει ότι οι κόκκοι του ρυζιού μολύνθηκαν με ορισμένα είδη του μύκητα *Penicillium*, τα οποία είναι τοξικά για διάφορα ζώα και προκαλούν αποχρωματισμό των κόκκων του ρυζιού (Kushiro M., 2015). Ένα άλλο διαβόητο ιστορικό ξέσπασμα μιας ασθένειας ή μυκοτοξικώσεως που προκαλείται από μυκοτοξίνη είναι η «Διατροφική Τοξική Αλευκία» (ΑΤΑ) που σχετίστηκε με την τοξίνη F-2 του μύκητα *Fusarium*, στη Ρωσία κατά τη διάρκεια του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου. Χιλιάδες κρούσματα ΑΤΑ προέκυψαν από την κατανάλωση μολυσμένων σιτηρών και σπόρων, οι οποίοι είχαν παραμείνει στον αγρό για μεγάλο χρονικό διάστημα, (Miller JD., 1995). Αργότερα, η ασθένεια αποδείχθηκε ότι προκαλείται από την τοξίνη T-2 που παράγεται από ένα είδος *Fusarium* sp. κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης σε υγρούς σπόρους, που παρέμειναν στους αγρούς κατά την διάρκεια του χειμώνα (Lutsky II, Mor N., 1981). Πιο πρόσφατα, στη δυτική Ινδία και την Κένυα, κρούσματα ηπατίτιδας με ταχέως αναπτυσσόμενα συμπτώματα επηρέασαν αρκετές εκατοντάδες ανθρώπους και προκάλεσαν πολλούς θανάτους. Ο ένοχος ήταν η αφλατοξίκωση, η οποία αναπτύσσεται λόγω της κατανάλωσης σπόρων που έχουν μολυνθεί έντονα με αφλατοξίνες (Azziz-Baumgartner E et al., 2005; Krishnamachari KA et al., 1975).

Οι μυκοτοξίνες, όπως γίνεται φανερό, με την ικανότητά τους να προσβάλλουν τα προϊόντα (δημητριακούς καρπούς, φρούτα, λαχανικά) σε διάφορα στάδια της καλλιέργειάς τους στον αγρό, είτε πριν ( π.χ. αφλατοξίνες) είτε μετά την συγκομιδή και κατά την αποθήκευση (π.χ. ωχρατοξίνη), αποτελούν μεγάλο κίνδυνο για την δημόσια

υγεία. Επίσης, τα περισσότερα αγροτικά προϊόντα χρησιμοποιούνται για την σύνθεση ζωοτροφών. Αυτό σημαίνει πως αν στις πρώτες ύλες υπάρχει κάποια μόλυνση από μυκοτοξίνες ή κατά την διάρκεια της παραγωγής γίνει επιμόλυνση, τότε, λόγω της εξαιρετικής αντοχής των μυκοτοξινών στις διάφορες επεξεργασίες και της ιδιότητάς τους να παραμένουν σταθερές για μεγάλο χρονικό διάστημα, μπορούν να μολύνουν τους ζωικούς οργανισμούς και κατ' επέκταση και τα προϊόντα τους. Συνεπώς, διαπιστώνεται ότι ο άνθρωπος μπορεί, μέσω της διατροφής, να προσβληθεί είτε άμεσα με την κατανάλωση μολυσμένων φυτικών προϊόντων, είτε έμμεσα με την κατανάλωση μολυσμένων ζωικών προϊόντων. Ωστόσο, το πόσο επηρεάζουν οι μυκοτοξίνες τον ανθρώπινο οργανισμό εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η συγκέντρωση της τοξίνης, το φύλλο και η ηλικία, ο βαθμός και η διάρκεια της έκθεσης, διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες, το σωματικό βάρος κ.α. (Bryden, 2007). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.1) αναφέρονται ενδεικτικά οι σημαντικότερες μυκοτοξίνες και οι τροφές στις οποίες βρίσκονται, οι μύκητες που τις παράγουν και την επίπτωσή τους στην υγεία του ανθρώπου και των ζώων.

Οι μυκοτοξίνες αποτελούν τον πιο σημαντικό, μη-μολυσματικό, χρόνιο παράγοντα διατροφικού κινδύνου, υψηλότερο από τα συνθετικά, τις φυτικές τοξίνες, τα πρόσθετα και τα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Επιπλέον, κατά την ανάλυση της επικυδυνότητας στις μελέτες Ανάλυσης Κινδύνου και Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (Hazard Analysis Critical Control Point, HACCP), αποτελούν Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου, ως πιθανός κίνδυνος.

Προκειμένου λοιπόν να μειωθεί ο κίνδυνος ύπαρξης μυκοτοξινών στις τροφές και στα τρόφιμα, 100 χώρες προσπάθησαν να θεσπίσουν κανονισμούς που θα αφορούσαν τα επιτρεπόμενα επίπεδα των μυκοτοξινών (Pose G et al., 2009). Γενικά, τα επιτρεπόμενα όρια στα τρόφιμα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση είναι 4-30 μέρη ανά δισεκατομμυριοστό (ppb) (Henry SH et al., 1999). Τα πιο αυστηρά όρια όσον αφορά τις αφλατοξίνες (4 μg/Kg σωματικού βάρους) τα θέτει η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), ενώ στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ) το αποδεκτό όριο είναι 20μg/Kg σωματικού βάρους) (Van Egmond HP, 2002). Αντιθέτως, την προβλεπόμενη ανεκτή εβδομαδιαία πρόσληψη είναι 100 ng/kg σ.β. Από την άλλη πλευρά, για την ωχρατοξίνη Α, η προβλεπόμενη ανεκτή εβδομαδιαία πρόσληψη είναι 100 ng/kg σ.β. (WHO: Food Additives Series 47, 2001). Ο αυστηρός έλεγχος της μόλυνσης των τροφίμων και των ζωοτροφών είναι ζωτικής σημασίας για τη μείωση των κινδύνων για την υγεία των ανθρώπων και των ζώων λόγω των μυκοτοξινών (Peraica M et al., 1999).

## 2.4 ΕΙΔΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

Οι σημαντικότερες μυκοτοξίνες, οι οποίες εμφανίζονται και μας απασχολούν περισσότερο λόγω της επίδρασής τους σε ανθρώπους και ζώα, είναι η ωχρατοξίνη (OTA), οι φουμονισίνες (FMn), οι τριχοθεσίνες (DON, DAS, T2), η ζεαραλενόνη (ZEN), οι αφλατοξίνες (AFs), εργοτοξίνη και η κιτρινίνη (Πίνακας 2.2). Από αυτές η DON και η AFs και τα αλκαλοειδή του εργοτισμού συνήθως παράγονται πριν τη συγκομιδή, ενώ η FMn και η OTA στη φάση μετά τη συγκομιδή (Bhat et al., 2010; Afsah-Hejri et al., 2013).

**Πίνακας 2.1: Οι σημαντικότερες μυκοτοξίνες και οι τροφές στις οποίες βρίσκονται, οι μύκητες που τις παράγουν και την επίπτωση τους στην υγεία του ανθρώπου και των ζώων (adapted from WHO: Basic food safety for health workers ; Liu Gt et al., 1991; Flieger M et al., 1997)**

ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΗ	ΚΥΡΙΑ ΤΡΟΦΗ	ΜΥΚΗΤΑΣ	ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ ΚΑΙ ΣΤΑ ΖΩΑ
ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ	ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΟΙ ΚΑΡΠΟΙ	Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus	ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ, ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ, ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΟΓΟΝΟΣ, ΤΕΡΑΤΟΓΟΝΟΣ, ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΟΣ
ΔΕΟΞΥΝΙΒΑΛΕΝΟΛΗ	ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΟΙ ΚΑΡΠΟΙ	Fusarium graminearum	ΕΜΕΣΗ, ΑΡΝΗΣΗ ΤΡΟΦΗΣ
ΤΡΙΧΟΘΕΣΙΝΕΣ	ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΟΙ ΚΑΡΠΟΙ	Fusarium	ΑΤΑ, ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΟΛΗ, ΝΑΥΤΙΑ, ΕΜΕΣΗ
ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΗ ΕΡΓΟΤΙΣΜΟΥ	ΣΙΚΑΛΗ, ΣΙΤΑΡΙ	Claviceps purpurea, Aspergillus, Penicillium, Rhizopus	ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ, ΓΑΓΚΡΑΙΝΑ, ΟΙΔΗΜΑ, ΕΝΤΟΝΟ ΑΛΓΟΣ, ΠΑΡΕΣΘΙΣΙΟΓΟΝΑ
ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΗ	ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΣ, ΡΥΖΙ	Fusarium moniliforme	ΠΙΘΑΝΑ ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ, ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΑΛΛΑΚΙΑ ΣΤΑ ΙΠΠΟΕΙΔΗ, ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟ ΟΙΔΗΜΑ ΣΤΟΥΣ ΧΟΙΡΟΥΣ, ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΟΙΣΟΦΑΓΟΥ
ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ Α	ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΟΙ ΚΑΡΠΟΙ	Penicillium verrucosum, Aspergillus ochraceus	ΝΕΦΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ, ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΟΛΗ, ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΟΣ, ΤΕΡΑΤΟΓΟΝΟΣ
ΠΑΤΟΥΛΙΝΗ	ΡΥΖΙ	Penicillium expansum	ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ, ΠΙΘΑΝΑ ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΟΣ
ΣΤΕΡΙΓΜΑΤΟΚΥΣΤΙΝΗ	ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΟΥ Σ ΚΑΡΠΟΙ	Aspergillus versicolor	ΗΠΑΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ, ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΟΣ
ΖΕΑΡΑΛΕΝΟΝΗ	ΣΙΤΑΡΙ, ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ, ΡΥΖΙ	Fusarium graminearum	ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ, ΟΧΙ ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Πίνακας 2.2: Είδη μυκήτων, μυκοτοξίνες που παράγουν και κυριότεροι μεταβολίτες των μυκοτοξινών στον οργανισμό (adapted from: Κουρουσέκος, 2008)

Μύκητες	Μυκοτοξίνες	Σημαντικότεροι Μεταβολίτες
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Αφλατοξίνες (B1, B2, G1, G2)	M1 (μεταβολίτης της B1)
<i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	Ωχρατοξίνη Α	
<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i>	Δεοξυνιβαλενόλη  T2 τοξίνη	HT2 τοξίνη
<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Ζεαραλενόνη	α-ζεαραλενόλη β-ζεαραλενόλη
<i>Fusarium moniliforme</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Φουμονισίνες: B1, B2, B3	

## 2.4.1 ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ

### 2.4.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΕΣ

Η ωχρατοξίνη (ΟΤ) είναι μια πολύ γνωστή και ευρέως διαδεδομένη μυκοτοξίνη σε όλο τον κόσμο (D.Ringot et al., 2006) Οι ωχρατοξίνες (Α, Β και Γ) είναι δευτερεύοντες μεταβολίτες των μύκητων *Penicillium* και *Aspergillus*, από τους οποίους κυρίως η μορφή Α (ΟΤΑ) ασκεί επικίνδυνες επιδράσεις σε ζώα και σε ανθρώπους, αντίστοιχα (D.Ringot et al., 2006; Van Der Merwe et al., 1965; A.E. Pohland, 1992).

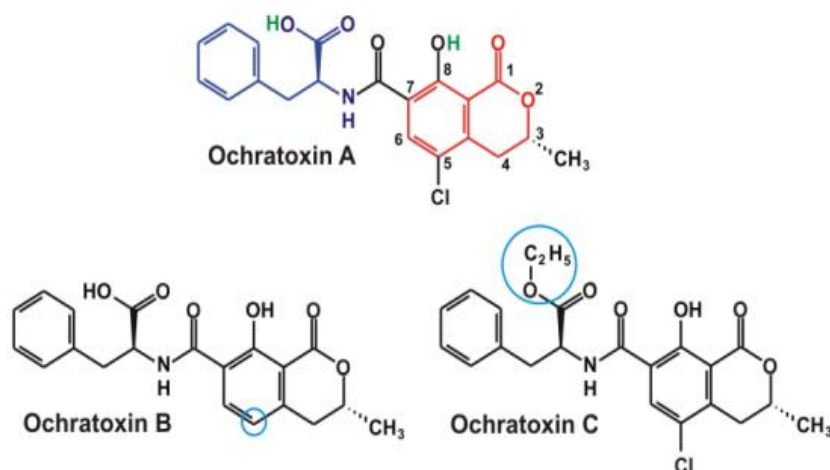
Η ΟΤΑ βρέθηκε για πρώτη φορά στην περιοχή των Βαλκανίων. Ωστόσο, μπορεί να ανιχνευθεί πρακτικά σε όλες τις περιοχές, συσσωρεύεται σε ζωοτροφές και σε ανθρώπινη τροφή λόγω των ευνοϊκών καιρικών συνθηκών και του μικροκλίματος ή/και λόγω ακατάλληλης αποθήκευσης συστατικών τροφίμων (G.J.A. Speijfers, 1993).

Η ωχρατοξίνη Α εμφανίζεται στο σιτάρι, στα φρούτα, στους ελαιούχους σπόρους και στις ζωοτροφές με αποτέλεσμα την παρουσία της στο γάλα, το κρέας, ακόμη και στα αυγά (D. Ringot et al., 2006; A.E. Pohland et al., 1992). Συνεπώς, πολλά ποτά (π.χ. κρασί, μύρα, καφές, τσάι, γάλα κ.λπ.) (Bellver Soto et al., 2014; Malir F. et al., 2015; M.E. Flores-Flores et al., 2015), καθώς και τα κοινά καθημερινά γεύματα (προϊόντα αρτοποιείου, κρέας και γαλακτοκομικά προϊόντα) περιέχουν, λίγο ή πολύ, ποσότητες ΟΤΑ (D. Ringot et al., 2006; El Khoury et al., 2010). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες

επισήμαναν την παρουσία της σε φυτικά φαρμακευτικά προϊόντα (W.B. Shim et al., 2014; A.J. Chen et al., 2015; Z. Verpikova, 2015), σε παράγοντες χρωματισμού τροφίμων (M. Solfrizzo et al., 2015), μπαχαρικά (V. Ostry et al., 2013; P. Jeswal et al., 2015; K.H. Do et al., 2015), ακόμη και σε εμφιαλωμένο νερό (A.T. Mata et al., 2015). Η ευρεία εμφάνιση της ΟΤΑ και η υψηλή θερμική σταθερότητά της, καθιστούν πολύ δύσκολη την εξάλειψη της από την τροφική αλυσίδα.

Η ΟΤΑ υπάρχει, όπως γίνεται φανερό, σε όλα τα στάδια της τροφικής αλυσίδας (δημητριακά, κρέας, φρούτα, κρασί, μύρα, καφές, κ.λπ.), και βάσει προηγούμενων μελετών, η παρουσία της μπορεί να σχετίζεται με τη χρόνια νεφρική νόσο των νεφρικών σωληναρίων, η νόσος αυτή ονομάζεται Βαλκανική Ενδημική Νεφροπάθεια (BEN) (Bui-Klimke, T., 2014; Pavlović N.M., 2013; Markovic B. et al., 1976; Chernozemsky I.N. et al., 1977). Η BEN είναι μια χρόνια προοδευτική ασθένεια με περίοδο 6-10 ετών που οδηγεί σε μη αναστρέψιμη νεφρική ανεπάρκεια. Ωστόσο, εκτός από τη μακροχρόνια έκθεση σε ΟΤΑ στις ενδημικές περιοχές, ορισμένοι άλλοι πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες υποστηρίζονται στην ανάπτυξη του BEN: αριστολοχικό οξύ, δηλητηρίαση από βαρέα μέταλλα, διαίτα με έλλειψη σεληνίου και γενετική προδιάθεση (Bui-Klimke, T., 2014; Pavlović, N.M., 2013; Pfohl-Leszkowicz, A., 2009). Λόγω της υψηλής σταθερότητάς του στη θερμότητα, η πλήρης απομάκρυνση του ΟΤΑ από τα τρόφιμα είναι πρακτικά αδύνατη (Duarte, S.C. et al., 2009), αν και υπάρχουν αρκετές προσεγγίσεις για τη μείωση της μόλυνσης από ΟΤΑ (Amézqueta S. et al., 2009; Ciconová P. et al., 2010; Pfohl-Leszkowicz A., 2015).

Οι ωχρατοξίνες (Ωχρατοξίνη Α: ΟΤΑ, Ωχρατοξίνη Β: ΟΤΒ και Ωχρατοξίνη C: ΟΤC) είναι τοξικοί μεταβολίτες διαφορετικών μυκήτων. Η δομή τους αποτελείται από ένα τμήμα διϋδρο-ισοκουμαρίνης συνδεδεμένο με μια φαινυλαλανίνη μέσω ενός αμιδικού δεσμού (Εικόνα 2.3). Επιπλέον, η ΟΤΑ και η ΟΤC περιέχουν επίσης μέρος παραχλωροφαινόλης. Η ΟΤΑ ( $C_{20}H_{18}ClNO_6$ , Όνομα IUPAC: N - {[ (3R) -5-χλωρο-8-υδροξυ-3-μεθυλ-1-οξο-3,4-διυδρο-1H-ισοχρωμεν-7-υλ] καρβονυλ} -L- φαινυλαλανίνη, μοριακό βάρος: 403,8) είναι ένας λευκός, άοσμος, θερμικός σταθερός, κρυσταλλικός στερεός παράγοντας (σημείο τήξεως: 168-173°C) με χαμηλή υδατική διαλυτότητα (Pohland, A.E, 1992; Pohland, A.E. et al., 1982). Η ΟΤΑ δεν εξαφανίζεται εντελώς κατά το ψήσιμο (Vidal, A. et al., 2015). Επιπλέον, η ΟΤΑ αντιστέκεται σε αποστείρωση ατμού υψηλής πίεσης στους 121°C (Trivedi, A.B. et al., 1992), και ακόμη και στους 250°C υποβαθμίζεται μόνο μερικώς (Boudra et al., 1995). Ακόμη και κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος καφέ, η ΟΤΑ αποσυντίθεται μόνο εν μέρει (Blanc, M. Et al., 1998; Van der Stegen, G.H. et al., 2001). Λόγω της δομής της ΟΤΑ, η μυκοτοξίνη παρουσιάζει ισχυρή ιδιότητα φθορισμού (Poór, M. et al., 2012; Poór, M. et al., 2013; Poór, M. et al., 2013). Ανάλογα με το μικροπεριβάλλον, η ΟΤΑ υπάρχει σε μη ιονικές, μονο-ανιονικές (ΟΤΑ<sup>-</sup>) και δι-ανιονικές (ΟΤΑ<sup>2-</sup>) μορφές.



Εικόνα 2.3: Χημικές δομές της Ωχρατοξίνης (σκούρο μπλε: μέρος φαινυλαλανίνης, κόκκινο: δακτύλιος διϋδρο-ισοκουμαρίνης, πράσινο: όξινά υδρογόνα), Β και Γ. Οι επισημασμένες δομές είναι χαρακτηριστικές για τα τρία διαφορετικά μόρια ωχρατοξίνης (ανοιχτό μπλε)

#### 2.4.1.2 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ & ΣΤΑ ΖΩΑ

Η ωχρατοξίνη Α ταξινομείται ως πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο (ομάδα 2B) (Stormer FC 1992, Codex Alimentarius 1998). Ωστόσο, όπως και με τις αφλατοξίνες, συχνά δεν είναι σαφές σε ποιο βαθμό οι μελέτες σε ζώα εφαρμόζονται στην τοξικότητα στους ανθρώπους. Η ερμηνεία των επιδημιολογικών μελετών είναι συχνά δύσκολη λόγω άλλων παραγόντων που δεν μπορούν να ελεγχθούν, συμπεριλαμβανομένης της συνύπαρξης με άλλες μυκοτοξίνες που μπορεί να έχουν συνεργιστικές επιδράσεις (Henry SH et al. 1999). (Stormer FC 1992, O'Brien E et al. 2005).

Η ΟΤΑ έχει αναφερθεί ότι είναι νεφροτοξικό, ανοσοκατασταλτικό, καρκινογόνο και τερατογόνο σε μελέτες σε ζώα (Tsubouchi H, 1995; O'Brien E et al., 2005) Οι τιμές LD50 από το στόμα είναι 20 mg / kg για νεαρούς αρουραίους και 3,6 mg / kg για νεοσσούς (Pitt JJ, 2000). Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί για την τοξικότητα της ΟΤΑ σε κυτταρικό επίπεδο. Η ΟΤΑ είναι ανταγωνιστής της λιγάσης φαινυλαλανίνης-tRNA, αναστέλλοντας έτσι τη σύνθεση πρωτεϊνών. Η παρουσία φαινυλαλανίνης ή ασπαρτάμης (ανάλογο της φαινυλαλανίνης) μειώνει την τοξικότητα από τον ανταγωνισμό με την ΟΤΑ (Walker R, 1999; Creppy EE et al., 1996). Άλλα ένζυμα επηρεάζονται επίσης από την έκθεση στην ΟΤΑ (Stormer FC, 1992; O'Brien E et al., 2005). Άλλοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν σχηματισμό προσθέτων DNA, απόπτωση, παρεμβολή με τον κυτταροσκελετό, υπεροξειδωση λιπιδίων και αναστολή μιτοχονδριακής αναπνοής (Stormer FC, 1992; O'Brien E et al., 2005). Η τοξικότητα της ΟΤΑ είναι πιο οξεία στους νεφρούς (Simon P 1996). Η πειραματική έκθεση σε ΟΤΑ προκαλεί διάφορους τύπους νεφρικών αλλοιώσεων σε ζωικά μοντέλα (Stormer FC, 1992). Μπορεί να προκαλέσει σοβαρές νεφρικές παθήσεις στους χοίρους στη Σκανδιναβία, καθώς και στα πουλερικά (Stormer FC, 1992; O'Brien E et al., 2005). Η απέκκριση της ΟΤΑ είναι πιο αργή στους ανθρώπους από ό, τι σε όλα τα άλλα είδη που έχουν δοκιμαστεί, παρέχοντας περισσότερο χρόνο επαφής για να προκληθεί βλάβη (Stormer FC, 1992). Η ΟΤΑ

θεωρείται ότι είναι η αιτία δύο χρόνιων παθήσεων, της Βαλκανικής Ενδημικής Νεφροπάθειας (BEN) και της Χρόνιας Διάμεσης Νεφροπάθειας (στη Βόρεια Αφρική), και των όγκων του ουροθηλίου στους ανθρώπους (O'Brien E et al., 2005). Οι προσθήκες DNA από ασθενείς στα Βαλκάνια παρέχουν περαιτέρω ενδείξεις για τη συμμετοχή της OTA στο BEN. Η σχέση μεταξύ της έκθεσης σε OTA νωρίς στη ζωή και του καρκίνου των όρχεων έχει υποτεθεί, βάσει επιδημιολογικών συσχετίσεων (Schwartz GG 2002). Η έκθεση σε OTA είναι υψηλή στη Δανία, πιθανώς λόγω της υψηλής κατανάλωσης σίκαλης και χοιρινού κρέατος και ο καρκίνος των όρχεων είναι επίσης υψηλός. Και τα δύο είναι υψηλότερα στη βόρεια Ευρώπη από ό, τι στη νότια και κεντρική Ευρώπη, και προφανώς έχουν αυξηθεί τα τελευταία 50 χρόνια.

Πόσο επικίνδυνη είναι η OTA για την ανθρώπινη υγεία εν τέλει; Πρόσφατες μελέτες κατέληξαν σε διαφορετικά συμπεράσματα. Η επιστημονική επιτροπή της ΕΕ για τα τρόφιμα συνέστησε ημερήσια πρόσληψη το πολύ 5 ng / kg σωματικού βάρους / ημέρα (FAO 2003-2004). Ωστόσο, άλλες μελέτες διαπίστωσαν ότι «δεν υπάρχουν κίνδυνοι για την υγεία που να συνδέονται με τη διατροφική πρόσληψη OTA στην Ολλανδία ·» (Εθνικό Ινστιτούτο Δημόσιας Υγείας και Περιβάλλοντος της Ολλανδίας, 2003,) · και ότι «...δεν έχουν αναφερθεί περιπτώσεις οξείας δηλητηρίασης στον άνθρωπο» (FAO / WHO Joint Expert Committee on Food Additives and Contaminants, 2001,). Ωστόσο, τα στοιχεία που προαναφέρθηκαν δείχνουν έντονα ότι η OTA προκαλεί οξεία και χρόνια ασθένεια σε ορισμένα σημεία και περιστάσεις.

#### **2.4.1.3 ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ**

Η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) περιορίζει την ωχρατοξίνη Α στα εισαγόμενα τρόφιμα, με μέγιστο 5 μg / kg (= ppb) σε ακατέργαστους κόκκους δημητριακών, 3 μg / kg σε μεταποιημένα τρόφιμα δημητριακών και 10 μg / kg σε αποξηραμένα φρούτα (σταφίδες) (FAO 2003-2004). Από τον Απρίλιο του 2005, η ΕΕ επέβαλε όρια για τις ωχρατοξίνες στο κρασί, το χυμό σταφυλιών και τον καφέ. Τα όρια είναι 2,0 μg / kg για κρασί και χυμό σταφυλιών, 5,0 μg / kg για καβουρδισμένο καφέ και 10,0 μg / kg για στιγμιαίο καφέ (FAO 2005). Στις ΗΠΑ, αντιθέτως, ο FDA δεν έχει ορίσει συμβουλευτικά όρια ή επίπεδα δράσης για τις ωχρατοξίνες σε οποιοδήποτε προϊόν.

#### **2.4.2 ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΗ**

##### **2.4.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΕΣ**

Οι φουμονισίνες παράγονται από το *Fusarium verticillioides* (γνωστό στην παλαιότερη βιβλιογραφία ως *Fusarium moniliforme*) και ορισμένα στενά συγγενικά είδη, ιδίως το *Fusarium proliferatum*. Ο κύριος βιότοπος αυτών των ειδών είναι ο αραβόσιτος. Έχει αποδειχθεί πρόσφατα ότι ορισμένες φουμονισίνες παράγονται επίσης από το *Aspergillus niger*, μια εντελώς απροσδόκητη πηγή (Leslie JF and Summerell BA 2006, Pitt JI and Hocking AD 2009). Η κύρια πηγή φουμονισινών είναι ο αραβόσιτος. Το *Fusarium*

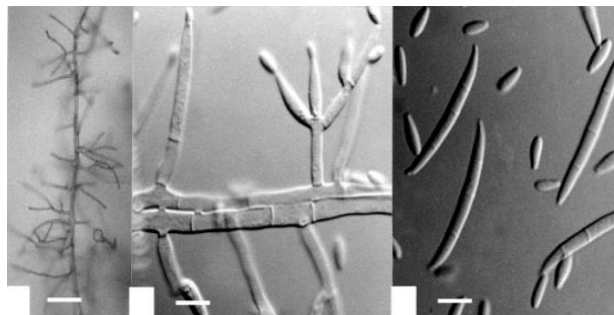


*verticillioides* είναι ενδημικό στον αραβόσιτο, οπότε οι φουμονισίνες είναι καθολικής εμφάνισης οπουδήποτε καλλιεργείται ο αραβόσιτος. Μη αποδεκτά επίπεδα εμφανίζονται μόνο σε φυτά που έχουν υποστεί καταπόνηση, λόγω ξηρασίας, κοντά στις ημερομηνίες συγκομιδής ή όπου έχουν υποστεί μεγάλη ζημιά από έντομα. Η πρόσληψη μπορεί να είναι υψηλή σε χώρες όπου ο αραβόσιτος είναι βασικό στοιχείο διατροφής, ιδίως στην Αφρική, σε ορισμένες χώρες της Νότιας και Κεντρικής Αμερικής και σε τμήματα της Κίνας

Στους 25°C, το *F. verticillioides* αναπτύσσεται ταχέως σε οποιοδήποτε τυπικό μυκολογικό μέσο συμπεριλαμβανομένου του άγαρ εκχυλίσματος ζύμης Czapek, άγαρ εκχυλίσματος βύνης και άγαρ δεξτρόζης πατάτας (PDA). Οι αποικίες είναι λευκού έως ωχρού «σολομού», με χαμηλό και συχνά σχοινώδη μυκήλιο και υφή «σκόνης» λόγω της παραγωγής αλυσίδων μικροκονιδίων. Το αντίστροφο χρώμα στο PDA είναι μεταβλητό, χλωμού «σολομού», γκριζωπό βιολετί, καφετί βιολετί έως βαθύ ιώδες. Αργή ανάπτυξη εμφανίζεται στους 37°C σε αυτά τα μέσα (Εικόνες 2.3, 2.4). Τα χαρακτηριστικά σπόρια του *Fusarium*, τα μακροκονίδια, παράγονται σε άγαρ πεπτόνης διχλωράνιου χλωραμφενικόλης (DCPA) ή άλλων ειδικών μέσων. Τα μακροκονίδια είναι μακρά (40-50 μm) και λεπτό σχεδόν ίσιο, λεπτό τοίχωμα, με βασικά κύτταρα σε σχήμα ποδιού. Τα μικροκονίδια είναι αιχμηρά και στα δύο άκρα ή σε σχήμα κλαμπ, μήκους 7-10 μm, και παράγονται σε αλυσίδες από μακρές μονές φιαλίδες (καρποφόρα κύτταρα). Το *Fusarium proliferatum* είναι πολύ παρόμοιο, αλλά οι αποικίες στο PDA δεν έχουν μοβ χρώματα στο πίσω μέρος και τα μικροκονίδια παράγονται από φιαλίδια με περισσότερους από έναν εύφορους λαιμούς (Leslie JF and Summerell BA 2006, Pitt JI and Hocking AD 2009).



**Εικόνα 2.4:** Αποτελέσματα της μελέτης, όπου παρατίθενται το είδος και ο αριθμός των δειγμάτων, καθώς και η συγκέντρωση της AFM1 που προσδιορίστηκε σε αυτά



**Εικόνα 2.5:** φιαλίδια που φέρουν αλυσίδες μικρομικωνιδίων, από αριστερά προς τα δεξιά η λευκή μπάρα είναι 50μm, 10μm, 10μm. Στην δεξιά εικόνα αποικονίζονται μικρο-, μακροκονίδια

Το *Fusarium verticillioides* μεγαλώνει περίπου στους 3-37°C, με βέλτιστη περίπου 25°C. Growth is possible down to 0.87 water activity, but is very slow below 0.90. Η ανάπτυξη είναι δυνατή σε 0,87 ενεργότητα ύδατος, αλλά είναι πολύ αργή κάτω από 0,90. Αυτό το είδος είναι σε θέση να αναπτυχθεί υπό μειωμένη παρουσία οξυγόνου, αλλά όχι σε πλήρη απουσία του. Οι φουμονισίνες παράγονται σε 0,92 α<sub>w</sub>. Η φυσιολογία του *F. proliferatum* είναι πολύ παρόμοια (Leslie JF and Summerell BA, 2006; Pitt JI and Hocking AD, 2009).

Οι φουμονισίνες είναι μια οικογένεια ενώσεων που αποτελούνται από σκελετό αλειφατικού οξέος αλυσίδας 19 ή 20-άνθρακα με άμινο ή πολυυδρόξυ πλευρικές ομάδες, δύο εκ των οποίων εστεροποιούνται με τρικαρβοξυλικό οξύ προπανίου. Αυτό παρέχει μια υδρόφοβη / υδρόφιλη διχοτομία μοναδική μεταξύ των μυκοτοξινών. Οι φουμονισίνες είναι δομικά παρόμοιες με τη σπονδυλική βάση του σφινγγολιπιδίου, σημαντικού συστατικού της μεμβράνης. Περισσότερα από 15 ομόλογα φουμονισίνης είναι γνωστά και χαρακτηρίζονται ως φουμονισίνη A, B, Γ και P (Braun, M.S et al., 2018; Marasas W.F., 1996). Επιπλέον, μεταξύ των φουμονισινών B, οι FB1, FB2 και FB3 είναι πιο συχνές. Η πιο σημαντική φουμονισίνη είναι γνωστή ως φουμονισίνη B1 (CAS 116355-30-0) και έχει μοριακό τύπο C<sub>34</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>15</sub>, με μοριακό βάρος 721. Οι περισσότερες φυσικώς απαντώμενες φουμονισίνες ανήκουν στη σειρά B, αλλά ορισμένα μέλη της σειράς C, όμοια με τη σειρά B, αλλά με την τελική ομάδα μεθυλίου απύσα, έχουν επίσης βρεθεί στον αραβόσιτο. Άλλες πολύ λιγότερο κοινές φουμονισίνες, που χαρακτηρίζονται διαφορετικά ως σειρές A και P, έχουν απομονωθεί από καθαρές μυκητιακές καλλιέργειες (Dejardins AE, 2006).

#### 2.4.2.2 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΩΝ

Η κατανάλωση φουμονισίνης προκαλεί: α) πνευμονικό οίδημα στους χοίρους, β) ηπατοτοξικότητα στους αρουραίους και γ) εγκεφαλομαλάκυνση στους ίππους (Dutton 1996; Norred et al., 1996). Ο ίππος αποτελεί το πλέον ευαίσθητο είδος. Στον άνθρωπο, οι φουμονισίνες που παράγονται από το *F. verticillioides* σχετίζονται με καρκίνο του οισοφάγου. Εκτεταμένες μελέτες σε περιοχές χαμηλής και υψηλής κατανάλωσης αραβοσίτου στη Νότια Αφρική έχουν δείξει αυτήν τη σύνδεση. Αυτή η ασθένεια είναι επίσης διαδεδομένη σε περιοχές της Κίνας και εμφανίζεται σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα, καθώς επίσης σε τμήματα του Ιράν, της βόρειας Ιταλίας, της Κένυας και σε μια μικρή περιοχή νότια των ΗΠΑ. Σε όλες αυτές τις περιοχές η κατανάλωση αραβοσίτου και προϊόντων αραβοσίτου είναι πολύ υψηλή. Υπάρχουν επίσης ορισμένες ενδείξεις ότι η υψηλή πρόσληψη φουμονισινών από αραβόσιτο σχετίζεται με ελαττώματα του νευρικού σωλήνα, όπως η δισχιδής σπονδυλική στήλη, σε περιοχές της Γουατεμάλας, της Νότιας Αφρικής, της Κίνας και ενός πληθυσμού κατά μήκος των συνόρων του Τέξας και του Μεξικού (Rheeder JP et al., 1992; WHO, 2001; JI Pitt 2014). Επίσης, συσχετίστηκε με καρκίνο του ήπατος που παρατηρήθηκε σε συγκεκριμένες περιοχές της Κίνας (Ueno et al., 1997). Για αυτό και ο Διεθνής Οργανισμός για την Έρευνα του Καρκίνου (IARC), την κατατάσει στην κατηγορία 2B, πιθανώς καρκινογόνος για τον άνθρωπο. (IARC, 1993 β)

### 2.4.2.3 ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή (ΕΚ, αριθ. 1881/2006) έχει ορίσει μέγιστα επιτρεπόμενα όρια 4 mg /kg συνολικών φουμονισινών στον μη μεταποιημένο αραβόσιτο και 200 mg/kg φουμονισινών σε τρόφιμα με βάση τον αραβόσιτο και τις παιδικές τροφές μετά την επεξεργασία. Η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων έχει θέσει κατευθυντήριες γραμμές για τα επίπεδα της φουμονισίνης σε μεταποιημένα τρόφιμα: προϊόντα αραβοσίτου ξηρού αλεσμένου, 2 mg/kg συνολικά φουμονισίνες, πίτουρο ξηρό αλεσμένου αραβοσίτου, 4 mg/kg και καθαρισμένος αραβόσιτος για ποπ κορν, 3 mg/kg.

### 2.4.3 ΤΡΙΧΟΘΕΣΙΝΗ

#### 2.4.3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΤΡΙΧΟΘΕΣΙΝΕΣ

Οι τριχοθεσίνες είναι μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες μυκοτοξινών, που προκαλούν σημαντική οικονομική επίδραση στις καλλιέργειες δημητριακών και σιτηρών κάθε χρόνο (Parry et al., 1995; McMullen et al., 1997). Τα γένη των μυκήτων που τις παράγουν περιλαμβάνουν τα *Fusarium*, *Myrothecium*, *Spicellum*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium*, *Trichoderma* και *Trichothecium* (Cole R.A et al., 2003) Αυτοί οι μύκητες, της τάξης *Hypocreales*, βρίσκονται σε όλο τον κόσμο και είναι προσαρμοσμένοι για αποικισμό και ανάπτυξη σε υποστρώματα με ένα ευρύ φάσμα υγρασίας και περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά. Μέσα στο γένος *Fusarium*, ορισμένα είδη είναι σημαντικά παθογόνα των φυτών και είναι οι αιτίες των μαρασμών, των κηλίδων και των «αυτιών» στους κόκκους, ιδίως στο σιτάρι, κριθάρι, βρώμη και αραβόσιτος (McMullen et al. 1997, Desjardins, A.E 2006). Τα είδη *Myrothecium* είναι παθογόνα του πεπονιού και της ντομάτας (Bean et al., 1984; Kutí et al., 1989). Το *Stachybotrys* βρίσκεται σε μια ποικιλία προϊόντων και πιο πρόσφατα, έχει βρεθεί ότι είναι ένας σημαντικός εσωτερικών χώρων μολυσματικός παράγοντας που έχει συσχετιστεί με την υγρασία των εσωτερικών χώρων και την εμφάνιση ασθενειών (Pestka et al., 1988). Τα είδη *Trichoderma* βρίσκονται συνήθως στο έδαφος και έχουν συσχετιστεί με ασθένειες των μανιταριών και των σταφυλιών (Degenkolb et al., 2008). Τα είδη *Trichothecium* απαντώνται συνήθως στο έδαφος και σε οργανικά υλικά που αποσυντίθενται (Farr et al., 1989).

Οι τριχοθεσίνες χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με τις λειτουργικές ομάδες (Ueno, 1977). Ο τύπος Α έχει μια λειτουργική ομάδα εκτός από την μια ομάδα κετο στον C-8. Αυτή είναι η μεγαλύτερη ομάδα και περιλαμβάνει τοξίνες όπως τοξίνη T-2, τοξίνη HT-2 και διακετοξυσιρπενόλη (DAS). Οι τριχοθεσίνες τύπου Β έχουν μια ομάδα κετο στο C-8 και περιλαμβάνουν την πιο διαδεδομένη τριχοθεσίνη, την δεοχονιβαλενόλη (DON) και τοξίνες τύπου DON, όπως 3-aDON, νιβαλενόλη NIV και Fusarenon-X. Η τρίτη κατηγορία (Τύπος Γ) έχει έναν δεύτερο δακτύλιο εποξειδίου στα C-7,8 ή C-9,10 και οι τοξίνες από την τέταρτη ομάδα (Τύπος D) περιέχει έναν μακροκυκλικό δακτύλιο μεταξύ C-4 και C-15 με δύο εστέρες- συνδέσεις. Τα τριχοθακένια τύπου Γ και τύπου Δ δεν παράγονται από μύκητες *Fusarium*.

#### 2.4.3.2 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΡΙΧΟΘΕΣΙΝΩΝ

Η τριχοθεσίνη  $T_2$  και ο μεταβολίτης της  $HT_2$ , ανευρίσκονται σε καρπούς, όπως σιτάρι, αραβόσιτο, κριθάρι (Rotter et al., 1996), ενώ λόγω της συνεργική τους δράσης η διαφοροποίηση της τοξικότητας της δράσης τους στους οργανισμούς είναι πολύ δύσκολη (Creppy 2002). Θεωρούνται ιδιαίτερα βλαπτικές για τους υδρόβιους οργανισμούς (π.χ. πέστροφα), τους αρουραίους και τα βοοειδή, καθώς επίσης, στις όρνιθες ύστερα από χορήγηση μεγάλης ποσότητας αυτών, εμφάνισαν οίδημα και αιμορραγία του εντερικού σωλήνα, νεκρωτικές αλλοιώσεις στην στοματική κοιλότητα και νευρολογικές διαταραχές που οδήγησαν στο θάνατο (MacRae et al., 1993).

Η δεοξυνιβαλενόνη (DON), που παράγεται από τους μύκητες *F.graminaceum* και *F.culmorum* (Chu, 2006), ανευρίσκεται συνήθως σε υψηλές συγκεντρώσεις στα αγροτικά προϊόντα, όπως καλαμπόκι, σιτάρι, ρύζι κ.ά., με αποτέλεσμα τον κίνδυνο της ασφάλειας των τροφίμων και των ζωοτροφών. Επίσης, είναι γνωστή και ως βομιτοξίνη, καθώς προκαλεί έμετο μετά την λήψη της. Στους χοίρους προκαλεί το σύνδρομο «άρνησης της τροφής», όπου εμφανίζεται όταν στο σιτηρέσιό τους ανευρίσκεται μεγάλη ποσότητα της τοξίνης (Patterson and Young, 1992; Rotter et al., 1996). Τα πουλερικά είναι πιο ευαίσθητα από τα βοοειδή, αλλά οι χοίροι αποτελούν την πιο ευπαθή ομάδα με σημαντικές οικονομικές απώλειες στην παγκόσμια χοιροτροφία (Hietaniemi and Kumpulainen, 1991; Awad et al., 2008).

Οι τριχοθεσίνες επιδρούν στην σύνθεση του DNA και του RNA, λόγω της επίδρασής τους στην 60S ριβοσωμιακής ομάδας των ευκαριωτικών κυττάρων και την αναστολή της δραστηριότητας της πεπτιδικής τρανσφεράσης. Αυτό οδηγεί σε στρες των ριβοσωμάτων και κατ' επέκταση την μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Awad et al., 2008; da Rocha et al., 2014). Έτσι και η νιβαλενόλη προκαλεί αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης και της σύνθεσης του DNA. Η κυτταροτοξική δράση της είναι οξεία ή χρόνια, και όταν συνυπάρχουν παράλληλα και άλλες τριχοθεσίνες (DON, DAS,  $T_2$ ) εμφανίζει αθροιστική δράση.

Η DAS και η  $T_2$  αποτελούν την αιτία εμφάνισης του συνδρόμου «Τροφική Τοξική Αλευκία», όπου περιγράφηκε στην Ρωσία, στην περιοχή Όρενμπουργκ, στην διάρκεια του 2<sup>ου</sup> Παγκοσμίου Πολέμου. Τα άτομα που είχαν νοσήσει είχαν καταναλώσει μεγάλη ποσότητα αγροτικών προϊόντων που είχαν επιμολυνθεί με τους μύκητες *F.sporotrichoides* και *F.proae* (da Rocha et al., 2014). Οι τριχοθεσίνες προκαλούν διαταραχές και προβλήματα του αναπαραγωγικού των ζώων, καθυστέρηση ανάπτυξης και ανασταλτική επίδραση τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο (Pestka, 2007; Bimezoka et al., 2007; Wan et al., 2013).

#### 2.4.4 ΖΕΑΡΑΛΕΝΟΝΗ

Η παγκόσμια εμφάνιση μυκοτοξινών αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την υγεία των ανθρώπων και των ζώων και εκτιμάται ότι το 25% της παγκόσμιας παραγόμενης καλλιέργειας είναι μολυσμένο (Fink-Gremmels J., 1999; Oswald IP et al., 2005). Η ζεαραλενόνη (ZEN) είναι μια μη στεροειδής οιστρογονική μυκοτοξίνη βιοσυνθεμένη μέσω μιας πολυκετιδικής οδού από μια ποικιλία μυκήτων του γένους

Fusarium που βρίσκονται συνήθως σε ζωοτροφές και τρόφιμα (Richard JL., 2007; Tabuc C. et al., 1994), κυρίως, είναι ένας μεταβολίτης των ειδών *F. culmorum*, *F. graminearum* και *F. sporotrichioides*, όπου το *F. graminearum* να είναι το είδος που είναι πιο υπεύθυνο για τις οιστρογονικές επιδράσεις που απαντώνται συνήθως σε ζώα εκτροφής. Οι αλκοολικοί μεταβολίτες της ZEN (α-ζεαραλενόλη, β-ζεαραλενόλη) είναι επίσης οιστρογόνοι (Cheeke, 1998a; E. Mohamed Zain, 2010). Η μόλυνσή των δημητριακών εμφανίζεται κυρίως σε περιόδους προ-συγκομιδής των καλλιέργειων τους σε ζεστά υγρά κλίματα και όχι σε περιόδους αποθήκευσης (A. Zinedine et al., 2007). Ο αραβόσιτος είναι ευαίσθητος σε λοίμωξη και μόλυνση από το Fusarium από το ZEN (A.C Chaytor et al., 2011; G. Schatzmayr et al., 2013)

Η ζεαρελενόνη είναι φαινολική ρεσορικυλικού οξέος μ-λακτόνη με ισχυρές οιστρογονικές ιδιότητες, (Schwarzer, 2009). Η ζεαρελενόνη είναι μια φυτοοιστρογονική ένωση γνωστή και ως 6- (10-υδροξυ-6-οξο-τρανς-1-undeceny) -β-ρεσορικυλικού οξέος 1- λακτόνη.

#### **2.4.4.1 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΖΕΑΡΑΛΕΝΟΝΗΣ**

Πριν από την ανακάλυψη και την εφαρμογή των σύγχρονων πρακτικών άλεσης, τα είδη Fusarium είχαν εμπλακεί σε πολλά ανθρώπινα κρούσματα μυκοτοξικόσεων (Hussein και Brasel, 2001). Τόσο η DON όσο και η ZEA, από τοξικογενή Fusaria τα οποία βρέθηκαν σε φλοιώδεις κόκκους στις ΗΠΑ, την Κίνα, την Ιαπωνία και την Αυστραλία, προκάλεσαν συμπτώματα που περιλάμβαναν ναυτία, έμετο και διάρροια (Bilgrami and Choudhary, 1998). Τα πρώτα δεδομένα για την χρόνια τοξικότητα και καρκινογόνο δράση της ζεαρελενόνης αναφέρθηκαν στην ικανότητά της να προκαλεί ανεπιθύμητες βλάβες στο ήπαρ και στην επακόλουθη ανάπτυξη ηπατοκαρκινώματος σε ποντίκια.(NTP 1982). Τα πιο ευαίσθητα είδη είναι οι χοίροι, στους οποίους η οιστρογονική δράση της επηρεάζει αρνητικά την αναπαραγωγική ικανότητά τους. Η ZEN και συγκεκριμένα οι μεταβολίτες της ανταγωνίζονται την δράση των οιστρογόνων, καταλαμβάνοντας τα τους ελεύθερους υποδοχείς στα κύτταρα στόχους (Osweiler, 1986; Brase et al., 2009; Wan et al., 2013). Με αποτέλεσμα, την αναπαραγωγική δυσλειτουργία, καθώς ασκούν τοξική επίδραση στα ωκύτταρα με τελικό αποτέλεσμα την εκφύλισή τους, προκαλούν αποβολές ή προβλήματα στην ανάπτυξη των εμβρύων στα πρώιμα στάδια ανάπτυξής τους κατά την κύηση, (Kuiper-Goodman et al., 1987; Hussein and Brasel, 2001; Zinedine et al., 2007). Έχουν αναπτυχθεί προβλήματα στα νεογέννητα ύστερα από κατανάλωση μολυσμένου γάλατος από ZEN (Bullerman, 2000).

Η επίδραση της οιστρογονικής της δράσης έχει συνδεθεί με την εμφάνιση οιστρογονικών συνδρόμων (π.χ. υπερπλασία ενδομήτριου και ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος) (Tomaszewski et al., 1998; Creppy, 2002). Περιπτώσεις πρώιμης εφηβείας σε υψηλό ποσοστό που σχετίστηκαν με την οιστρογονική δράση της ZEN , λόγω αυξημένης συγκέντρωσής στον ορό του αίματος (19μg/ml -100μg/ml) και στα τρόφιμα πληθυσμού από το Πουέρτο Ρίκο και Ν.Α. Ουγγαρία (Schoental, 1983; Saenz et al., 1985; Suetz, 1997). Η ZEN προκαλεί κυρίως πρώιμες ορμονικές διαταραχές που οδηγούν στην πρώιμη ανάπτυξη των μαστών σε νεαρά κορίτσια και γενικώς στην πρώιμη ωρίμανση του ενδοκρινολογικού συστήματος, διαταραχή της έκκρισης των ορμονών που σχετίζονται με την εμφάνιση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Azizi et al., 2012; Wan et al., 2013). Σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Ερευνών κατά του Καρκίνου (IARC) η ZEN ταξινομείται στην κατηγορία 3, όπου σύμφωνα μετά μέχρι

τώρα ερευνητικά δεδομένα η ZEN δεν αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την πρόκληση καρκίνου στον άνθρωπο.

#### **2.4.4.2 ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ**

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) η πρώτη ρύθμιση για την ZEN πραγματοποιήθηκε το 1996 από 6 χώρες, αλλά έως το 2003 για την τοξίνη ZEN σε τρόφιμα και ζωοτροφές συμμετείχαν στην ρύθμιση 16 χώρες (FAO 2004). Τα όρια για την ZEN στον αραβόσιτο και σε άλλα δημητριακά κυμαίνονται σήμερα από 50 έως 1000  $\mu\text{g} / \text{kg}$ , όπου στην Ευρώπη τα ακριβή επιτρεπτά όρια ορίζονται στον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (ΕΚ) αριθμ. 1881/2006, όπου τα ανώτερα όρια κυμαίνονται από 50  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  200  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ .

#### **2.4.5 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ**

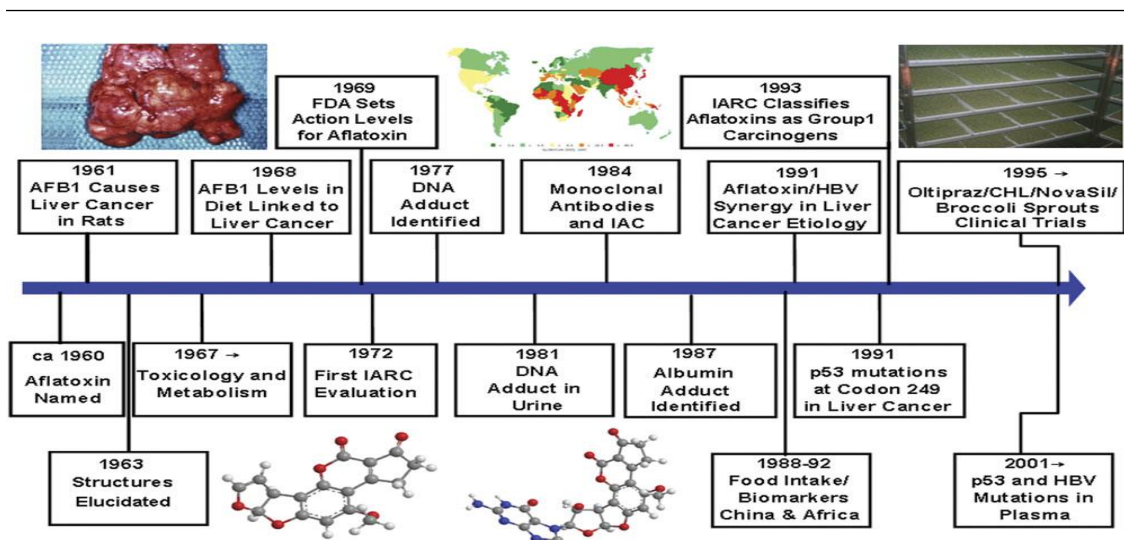
##### **2.4.5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ**

Από όταν ανακαλυφθήκαν για πρώτη φορά οι αφλατοξίνες, πριν 50 με 60 χρόνια, και μέχρι σήμερα έχουν συνδεθεί με τον τίτλο των «πανταχού παρόντων» μολυσματικών παραγόντων της τροφικής αλυσίδας των ανθρώπων σε ολόκληρο των οικονομικά αναπτυσσόμενο κόσμο. Οι ανεπιθύμητες τοξικολογικές συνέπειες αυτών των ενώσεων σε πληθυσμούς είναι αρκετά ποικίλες εξαιτίας ενός ευρέος φάσματος εκθέσεων που οδηγούν σε οξείες επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένου του γρήγορου θανάτου και χρόνιων αποτελεσμάτων όπως το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Επιπλέον, αναδυόμενες μελέτες περιγράφουν μια ποικιλία γενικών αρνητικών επιπτώσεων στην υγεία που σχετίζονται με την αφλατοξίνη, όπως η μειωμένη ανάπτυξη στα παιδιά. Οι εκθέσεις σε αφλατοξίνη έχουν επίσης αποδειχθεί ότι αυξάνουν, πολλαπλασιαστικά, τον κίνδυνο καρκίνου του ήπατος σε άτομα που έχουν μολυνθεί χρόνια με τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV), αποδεικνύοντας την επιβλαβή επίδραση που μπορεί να δημιουργήσουν για την ανθρώπινη υγεία ακόμη και χαμηλά επίπεδα τοξινών στη διατροφή. Οι επιπτώσεις στη έκθεση στην αφλατοξίνη στη δημόσια υγεία είναι διαδεδομένες.

##### **2.4.5.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ**

Οι αφλατοξίνες ανακαλύφθηκαν στα τέλη του 1950 αρχές του 1960, όταν αναγνωρίστηκαν ως ο αιτιολογικός παράγοντας στην ασθένεια «turkey X», μια επιδημία που αφορούσε θανάτους πολλών γαλόπουλων, παπιών, κοτόπουλων που είχαν διατραφεί μολυσμένες αραχίδες με τον μύκητα *Aspergillus flavus* και προέρχονταν από την Νότια Αμερική (Blount, 1961). Οι έρευνες που διεξήχθησαν και αποκάλυψαν ότι η αιτία ήταν ο *A. flavus*, βρήκαν και πως τα στελέχη του μύκητα που απομόνωσαν από την τροφή των πουλερικών ήταν ικανά να προκαλέσουν τα συμπτώματα του συνδρόμου «turkey X». Κατά συνέπεια, το όνομα «αφλατοξίνη» (*A. flavus* τοξίνη) αποδόθηκε στους τοξικούς παράγοντες. Μεταγενέστερες μελέτες από εκχυλίσματα αραχίδων μολυσμένων με *A. flavus* επιβεβαίωσαν ότι αυτοί οι παράγοντες ήταν ικανοί να προκαλέσουν οξεία ηπατική νόσο σε παπάκια και καρκίνο του ήπατος σε αρουραίους

(Lancaster et al., 1961; Sargeant et al., 1961). Η ανίχνευση αφλατοξινών σε εκχυλίσματα μολυσμένου αλευριού φυσιτικών διευκολύνθηκε από τον έντονο φθορισμό τους σε υπεριώδες φως και σύντομα μετά καθορίστηκαν οι μεταβολίτες με πανομοιότυπες φυσικές και χημικές ιδιότητες από καλλιέργειες *A. flavus* (Nesbitt et al., 1962; Van der Zijden et al., 1962). Περίπου την ίδια περίοδο στις Η.Π.Α. παρατηρήθηκε μία έξαρση καρκίνου του ήπατος στις πέστροφες, η οποία αποδόθηκε στη μόλυνση από αφλατοξίνες, ενός μίγματος βαμβακόσπορου, συστατικού της διατροφής αυτών των ψαριών. Άλλα σημαντικά γεγονότα που οφείλονται από τις αφλατοξίνες, ήταν το 1974 σε διάφορες αγροτικές περιοχές της Ινδίας, όπου καταγράφηκαν συνολικά 397 περιστατικά ηπατίτιδας και 106 θάνατοι, από το 1981 μέχρι και το 2004 έχουν καταγραφεί τουλάχιστον 500 περιστατικά με 200 θανάτους στην Κέννα και μόλις το 2004 και 2005 καταγράφηκαν 317 περιστατικά οξείας αφλατοξίκωσης με 125 θανάτους (CDCP, 2004; Kumar et al., 2017). Αυτά τα ευρήματα προκάλεσαν εκτεταμένες ερευνητικές προσπάθειες, οι οποίες συνεχίζονται μέχρι σήμερα, για την εκτίμηση των πιθανών κινδύνων για την υγεία που προκύπτουν από τη μόλυνση της ανθρώπινης τροφοδοσίας και για την ελαχιστοποίηση της έκθεσης. Στο ακόλουθο σχήμα (Εικόνα 2.6) παρουσιάζεται ένα χρονοδιάγραμμα που επισημαίνει τα βασικά ορόσημα γεγονότα για την ανακάλυψη, τον τοξικολογικό χαρακτηρισμό και τη ρύθμιση των αφλατοξινών.



**Εικόνα 2.6:** Χρονοδιάγραμμα για βασικά γεγονότα στην ανακάλυψη, τοξικολογική αξιολόγηση, μοριακή επιδημιολογία και ρύθμιση των αφλατοξινών. (FDA: Food and Drug Administration, IARC: Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο, IAC: χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας, CHL: χλωροφυλλίνη.) (adapted from: Thomas W. Kensler et al. 2010)

Μεγάλης σημασία ήταν η πρόωμη ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων ικανών να ανιχνεύουν και να ποσοτικοποιούν τις αφλατοξίνες σε εκχυλίσματα τροφίμων και σε εκχυλίσματα από την συγκομιδή των τροφίμων. Η ανάπτυξη της ανάλυσης περιλάμβανε εκτεταμένες διεθνείς συνεργασίες μεταξύ κυβερνητικών, βιομηχανικών και ακαδημαϊκών ερευνητικών ομάδων, και η προκύπτουσα μεθοδολογία ενίσχυσε σημαντικά την ικανότητα των ρυθμιστικών οργανισμών και των παραγωγών τροφίμων να παρακολουθούν την εφοδιαστική αλυσίδα των τροφίμων και να ελαχιστοποιούν τη μόλυνση. Αυτή η μεθοδολογία επέτρεψε επίσης παρατηρητικές επιδημιολογικές μελέτες

που διεξήχθησαν κατά τη διάρκεια του 1968-1985 για την αξιολόγηση της συσχέτισης της κατάποσης αφλατοξίνης και της συχνότητας εμφάνισης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC) στους ανθρώπινους πληθυσμούς. Ο δομικός χαρακτηρισμός και η σύνθεση των κύριων αφλατοξινών, που ολοκληρώθηκαν το 1963, διευκόλυνε τις μηχανιστικές μελέτες για την τοξικολογία και τον μεταβολισμό τους, οδηγώντας στον εντοπισμό του κύριου συμπλόκου DNA- προσθήκης της αφλατοξίνης B1 το 1977 και στην απόδειξη της απέκκρισης στα ούρα το 1981. Ανάπτυξη μονοκλωνικών αντισωμάτων ειδικά για να αναγνωρίζουν την αφλατοξίνη B1, παρείχε μια βάση για την ανάπτυξη μίας μεθοδολογίας ανοσοσυγγένειας όχι μόνο για την ανάλυση των εκχυλισμάτων τροφίμων, αλλά και για τον ποσοτικό προσδιορισμό της απέκκρισης του DNA-προσθήκης της στο προϊόν και άλλων μεταβολιτών. Αυτό δρα ως βιοδείκτης και αποτέλεσε το εργαλείο να εκτιμηθεί η μοριακή επιδημιολογία της ατομικής έκθεσης στην αφλατοξίνη μέσα στον ανθρώπινο πληθυσμό. Τα αποτελέσματα τέτοιων μελετών στην Κίνα και την υποσαχάρια Αφρική, μαζί με συσσωρευμένα πειραματικά στοιχεία αποτέλεσαν τη βάση για την ταξινόμηση της αφλατοξίνης ως καρκινογόνου για τον άνθρωπο από τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο το 1994. Τέτοιου προσανατολισμού έρευνες συνεχίζονται μέχρι σήμερα και γίνονται προσπάθειες για την ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθοδολογιών παρέμβασης για τον μετριασμό των επιπτώσεων στην υγεία της αναπόφευκτης έκθεσης στην αφλατοξίνη.

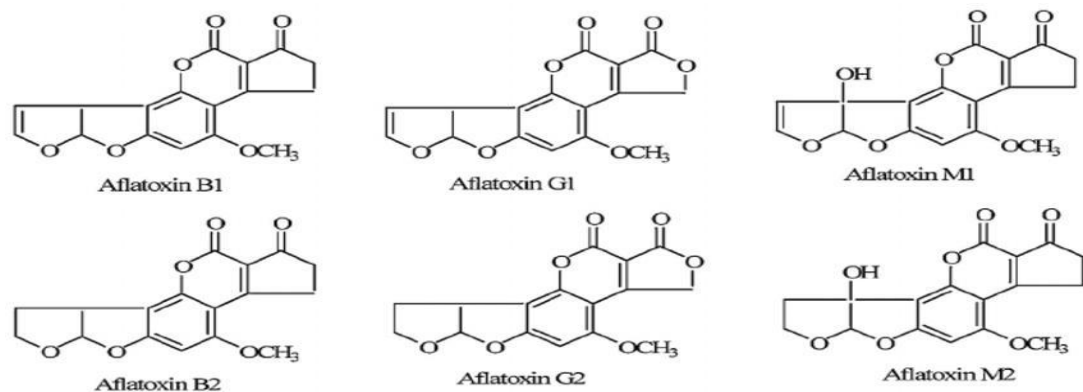
Βασικά στοιχεία μιας στρατηγικής για τον προσδιορισμό των κινδύνων για την υγεία από περιβαλλοντικούς παράγοντες και για τη χάραξη στρατηγικών για την εξάλειψη των επιπτώσεών τους εξαρτάται από: τη διαθεσιμότητα ενός ζωικού μοντέλου που μιμείται την ανθρώπινη ασθένεια, την επιδημιολογική παρατήρηση που συνδέει την έκθεση με τη συχνότητα εμφάνισης νόσων, την ανάπτυξη μοριακών βιοδεικτών που βασίζονται σε μηχανισμούς μοντέλα ζώων, επικύρωση αυτών των βιοδεικτών σε ζώα με μελέτες δοσοαπόκρισης και μετριασμού, επικύρωση βιοδεικτών σε μεταβατικές μελέτες σε εκτεθειμένους ανθρώπους και συσχέτιση βιοδεικτών με κίνδυνο σε προοπτικές μελέτες εκτεθειμένων ανθρώπων. Συλλογικά, τα δεδομένα για την αφλατοξίνη και τον καρκίνο του ήπατος του ανθρώπου υποδηλώνουν τη σημασία αυτών των στοιχείων και παρέχουν ένα μοντέλο για το σχεδιασμό μελλοντικών μελετών για την αξιολόγηση του κινδύνου έκθεσης σε άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Τα αποτελέσματα από έρευνες μοριακής επιδημιολογίας αφλατοξινών και HCC αντιπροσωπεύουν ένα από τα πιο εκτεταμένα σύνολα δεδομένων στον τομέα της τοξικολογίας του περιβάλλοντος.

### **2.4.5.3 ΔΟΜΗ-ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ-ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ**

Το ορόσημο επίτευξης της διευκρίνισης της δομικής της αφλατοξίνης B1 επιβεβαιώθηκε από τη συνολική του σύνθεση το 1963 (Asao et al., 1963). Χημικά, οι αφλατοξίνες είναι υψηλά υποκατεστημένες κουμαρίνες που περιέχουν ένα τμήμα προσκολλημένου διυδροφουροφουρανίου (Εικ. 2.7). Τέσσερις αφλατοξίνες εμφανίζονται φυσικά: B1, B2, G1 και G2. Τα μέλη της σειράς κυανού φθορισμού (B) χαρακτηρίζονται από σύντηξη ενός δακτυλίου κυκλοπεντενόνης στον δακτύλιο λακτόνης του τμήματος κουμαρίνης, ενώ οι πράσινες τοξίνες φθορισμού (G) περιέχουν έναν συντηγμένο δακτύλιο λακτόνης. Οι αφλατοξίνες B1 και B2 (AFB1 και AFB2) ονομάστηκαν έτσι λόγω του ισχυρού μπλε φθορισμού τους στο υπεριώδες φως, ενώ οι αφλατοξίνες G1 και G2 (AFG1 και AFG2) φθορίζονταν πρασινωπό κίτρινο. Αυτές οι ιδιότητες διευκόλυναν την πολύ ταχεία ανάπτυξη στις αρχές της δεκαετίας του 1960 μεθόδων παρακολούθησης σιτηρών και άλλων προϊόντων διατροφής για την παρουσία των τοξινών. Οι AFB1 και AFG1



κατέχουν ακόρεστο δεσμό στη θέση 8,9 στον τελικό δακτύλιο φουρανίου, και επακόλουθες μελέτες έδειξαν ότι η εποξείδωση σε αυτή τη θέση ήταν κρίσιμη για την καρκινογόνο ισχύ τους (Groopman and Kensler, 2005). Τα AFB2 και AFG2 είναι σχετικά μη τοξικά, εκτός εάν οξειδώνονται πρώτα μεταβολικά σε AFB1 και AFG1 in vivo. Είναι κρυσταλλικές ενώσεις, διαλυτές στη μεθανόλη, στο χλωροφόρμιο, στην ακετόνη, στο ακετονιτρίλιο και στο νερό. Έκθεσή τους σε υπεριώδες φως έχει ως αποτέλεσμα τον έντονο φθορισμό τους με μήκος κύματος 365 nm. Είναι ενώσεις που τις χαρακτηρίζει η μεγάλη σταθερότητα σε θερμοκρασίες που ξεπερνούν τους 100°C, όπως και σε απουσία φωτός και ιδίως της υπεριώδους ακτινοβολίας (Standard Committee of Foods, SCF 1994). Για παράδειγμα το σημείο τήξης της B1 είναι περίπου 269°C, της B2 περίπου 286-289°C και της M1 περίπου 299°C (Iqbal et.al., 2017). Γίνεται αντιληπτό πως και υπό συνθήκες παστερίωσης ή άλλης θερμικής επεξεργασίας των τροφίμων είναι δύσκολο να αποτραπεί η μόλυνση. Οι αφλατοξίνες είναι χημικά παράγωγα της διφουροκουμαρίνης, όπου στο ένα άκρο του μορίου τους περιέχεται λακτονικός δακτύλιος, ευαίσθητος σε αλκαλικό περιβάλλον όπου διασπάται σε ενώσεις με τοξική δράση μικρότερη της αρχικής (Lee et al., 1981). Με την παρουσία οξέος και την προσθήκη μορίου νερού στο διπλό δεσμό του φουρανικού δακτυλίου οι αφλατοξίνες B1 και G1 μετατρέπονται σε αφλατοξίνες B2 και G2. Όπως προαναφέρθηκε, σημαντικότερος μεταβολίτης των αφλατοξινών στον οργανισμό των ζώων είναι η AFM1, που αποτελεί τον 4-υδροξυ-μεταβολίτη της AFB1.



Εικόνα 2.7: Οι χημικοί τύποι αφλατοξινών (adapted from: Zhang et al., 2014)

Η AFB1 μεταβολίζεται στο ήπαρ από το σύστημα ενζύμων P450 στο τελικό καρκινογόνο την αφλατοξίνη B1-8,9-εποξείδιο (AFBO), το οποίο έχει δύο ισομερή: ενδο-8,9-εποξείδιο και εξω-8,9-εποξείδιο (Baertschi et al. 1988, KD Raney et al., 1992). Αυτή η μεταβολική μετατροπή πραγματοποιείται κυρίως στο ανθρώπινο ήπαρ από τα CYP3A4 και CYP1A2. Σε υψηλές συγκεντρώσεις AFB1, το CYP3A4 είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός σχηματισμού AFBO που παράγει ουσιαστικά μόνο το έξω ισομερές AFBO (Ueng et al., 1995) αν και αυτό φαίνεται να αντιστρέφεται όταν η συγκέντρωση υποστρώματος είναι χαμηλή. Επιπλέον, το CYP1A2 βρέθηκε να παράγει περισσότερο από το έξω ισομερές από το CYP3A4 σε αυτές τις χαμηλές συγκεντρώσεις (Gallagher et al., 1996, 1994). Η εξαιρετικά ηλεκτροφιλική φύση αυτού του ενδιάμεσου

επιτρέπει σε αυτήν να αντιδρά αυθόρμητα με τις βιολογικές αμίνες των πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Σε αντίδραση με DNA, το AFBO δεσμεύεται ομοιοπολικά στη θέση N7 στη γουανίνη σχηματίζοντας το σύμπλοκο προσθήκης AFB1-N7-γουανίνη. Το έξω ισομερές έχει αποδειχθεί ότι έχει πολύ μεγαλύτερη συγγένεια με την γουανίνη από το ένδο ισομερές, επομένως το AFB1-εξω-8,9-εποξειδίο θεωρείται ότι είναι ο κύριος καρκινογόνος μεταβολίτης (Essigmann et al., 1977; Iyer et al., 1994; Gopalakrishnan et al., 1989; Johnson and Guengerich, 1997).

Η AFB1 έχει τον τίτλο της πιο επικίνδυνης καρκινογόνου ουσίας που απαντάται στη φύση και γι' αυτό τον λόγο, από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) και σύμφωνα με την κλίμακα ταξινόμησης του Διεθνούς Οργανισμού Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC), κατατάσσεται στην Ομάδα 1 στους καρκινογόνους παράγοντες για τον άνθρωπο (Rousi et al., 2007). Ενώ ο μεταβολίτης της, η AFM1, ταξινομείται στην κατηγορία 2B, δηλαδή πιθανά καρκινογόνος ουσία για τον άνθρωπο (Cathey et al., 1994; Moss 2002, Creppy 2002). Σε έρευνα του Coel και Cox (1981), ύστερα από σύγκριση της καρκινογόνου δράσης της AFB1 και βενζοπυρενίου ( αρωματικός υδρογονάνθρακας και το ισχυρότερο μεταλλαξιογόνο στοιχείο της σύνθεσης του καπνού του τσιγάρου), αναφέρουν ότι η δράση της AFB1 είναι 1000 φορές ισχυρότερη από την αντίστοιχη του βενζοπυρενίου. Επίσης, η AFB1 είναι περίπου 4 φορές πιο τοξική από την AFB2, ενώ η σειρά τοξικότητας σε φθίνουσα διάταξη από τα αριστερά προς τα δεξιά είναι B1>G1>B2>G2 (IARC, 2012; Bdosia et al., 2013). Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τα Τρόφιμα (EET), στις 23ης Σεπτεμβρίου 1994, χαρακτήρισε τις αφλατοξίνες ως γονιδιοτοξικά καρκινογόνα και πως επιδρούν στην ανθρώπινη υγεία σε μεγαλύτερο βαθμό από τις υπόλοιπες μυκοτοξίνες, καθώς μεταφέρονται στον άνθρωπο διαμέσου της τροφικής αλυσίδας.

Οι άνθρωποι εκτίθενται σε αφλατοξίνες από την κατανάλωση προϊόντων που έχουν μολυνθεί από στελέχη *A. flavus* ή *Aspergillus paraciticus* κατά την ανάπτυξη, τη συγκομιδή ή την αποθήκευση. Γενικά, οι τροφές μπορεί να περιέχουν AFB1 και AFB2 σε αναλογίες συγκέντρωσης 1,0 έως 0,1, και όταν εμφανίζονται και οι τέσσερις αφλατοξίνες, υπάρχουν αναλογίες AFB1, AFB2, AFG1 και AFG2 1,0: 0,1: 0,3: 0,03. Ωστόσο, αυτές οι αναλογίες μπορούν να είναι μεταβλητές. Τα δημητριακά και τα τρόφιμα που έχουν μολυνθεί με αφλατοξίνες περιλαμβάνουν καλαμπόκι, φιστίκια, *milo*, σόργο, κόπρα και ρύζι (Busby and Wogan, 1984). Παρότι η μόλυνση από τους μύκητες μπορεί να είναι παγκόσμια, τα επίπεδα ή οι τελικές συγκεντρώσεις αφλατοξινών ,όμως,στο προϊόν των σπόρων μπορεί να κυμαίνονται από λιγότερο από 1 μg / kg (1 ppb) έως μεγαλύτερο από 12.000 μg/kg (12 ppm). Πράγματι, σε ένα πρόσφατο ξέσπασμα θανάτου ανθρώπων που προκλήθηκαν από αφλατοξίνη στην Κένυα, η ατομική ημερήσια έκθεση του AFB1 εκτιμήθηκε ότι ήταν 50 mg / ημέρα (Probst et al., 2007). Οι εκτιμήσεις έκθεσης με βάση τα επίπεδα αφλατοξίνης που βρέθηκαν σε μεμονωμένα δείγματα κόκκων ή ελαιούχων σπόρων συγχέονται με τη διακύμανση των επιπέδων τοξινών μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων εντός πολλών κόκκων. Για παράδειγμα, σε πολλές παρτίδες φυστικιών μόνο ένα φυστίκι στα 10.000 μπορεί να περιέχει αφλατοξίνη, αλλά το επίπεδο εντός αυτού του φυστικίου μπορεί να είναι έως αρκετές εκατοντάδες μικρογραμμάρια. Κατά συνέπεια, η μόλυνση ολόκληρης της αποστολής σε επίπεδα που υπερβαίνουν το επιτρεπτό επίπεδο μπορεί να προκύψει όταν το εμπόρευμα έχει αλεσθεί, αναμιχθεί και υποστεί επεξεργασία (Campbell et al., 1986). Πράγματι, η ετερογένεια της κατανομής τοξινών έχει επιβεβαιωθεί ως η κύρια πηγή σφάλματος του προσδιορισμού της μυκοτοξίνης σε τρόφιμα και ζωοτροφές. Για αυτούς

τους λόγους, οι εκτιμήσεις της ανθρώπινης κατανάλωσης αφλατοξίνης με βάση την ανάλυση δειγμάτων στο τελικό προϊόν στις αγορές τροφίμων και στα τρόφιμα είναι πολύ ασαφείς (Richard et al., 1993).

#### 2.4.5.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ & ΣΤΑ ΖΩΑ

Η τοξικότητα της ομάδας των αφλατοξινών στον άνθρωπο και τα ζώα έχει μελετηθεί από διάφορες έρευνες ανά τον κόσμο. Πολλοί είναι οι παράγοντες που μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην επίδραση της τοξικότητας των αφλατοξινών. Τέτοιοι παράγοντες είναι για παράδειγμα το είδος των ζώων, το φύλο, η ηλικία, η θρεπτική κατάσταση, η ποσότητα των ζωοτροφών που καταναλώνουν, το συνολικό χρονικό διάστημα από την πρόσληψή τους (Eaton et al., 1993; Wild and Turner, 2002). Οι αφλατοξίνες ύστερα από την κατανάλωση μολυσμένης τροφής, απορροφούνται από τον γαστρεντερικό σωλήνα, εισέρχονται στην αιματική κυκλοφορία και κατανέμονται στους διάφορους ιστούς και όργανα, όπως στο ήπαρ που υφίσταται τη μεγαλύτερη τοξική τους δράση. Για την διεκπεραίωση του μεταβολισμού των αφλατοξινών συμμετέχουν διάφορα είδη ενζύμων, όπου αυτά αποτελούνται από τις οξειδάσεις, το κυτόχρωμα P-450 και την αναγωγή του, την φλαβοπρωτεΐνη. Με την συμβολή των ενζύμων αυτών πραγματοποιείται η οξείδωση της AFB1 και κατ' επέκταση συντελείται η παραγωγή των μεταβολιτών της, όπως η AFQ1 (αφλατοξίνη Q1), η AFM1 και η AFB2. Οι μεταβολίτες αυτοί είναι υδατοδιαλυτοί και η αποβολή τους γίνεται εύκολα από τον οργανισμό (Masri et al., 1974; Orti et al., 1989). Επίσης, η AFB1 με την επίδραση του κυτοχρώματος P-450 μεταβολίζεται στο 8, 9 εποξειδίου της AFB1, το οποίο δύναται να ενωθεί με τη γουανίνη του DNA, οδηγώντας στην έναρξη της καρκινογένεσης, ή να ενωθεί με πρωτεΐνες, π.χ. αλβουμίνες (Montesano et al., 1997; Wild and Tuner, 2002). Το εποξειδίου αυτό της AFB1 εντοπίζεται με δύο ισομερή, το ένδο- και το έξω- εποξειδίου, όπου το δεύτερο θεωρείται το πλέον τοξικό και με σοβαρή ηπατοκυτταροτοξικότητα (Berry, 1988; Neal et al., 1981).

Η τοξική επίδραση της AFB1 στα ζώα αφορά την αναλογία σχηματισμού 8,9 εποξειδίου της AFB1 και σχηματισμού άλλων λιγότερο τοξικών μεταβολιτών (Pettersson, 1973). Μια παρόμοια μορφή εποξειδίου, που δύναται να αντιδράσει με το DNA, σχηματίζεται κατά τον μεταβολισμό και της AFM1 στον οργανισμό των ζώων (Heinonen et al., 1996; Neal et al., 1998).

Οι αφλατοξίνες μπορούν να προκαλέσουν τοξικές οξείες και χρόνιας εμφάνισης τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο. Συγκεκριμένα, η χρόνια αφλατοξίνωση προκαλεί την μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των νεαρών ατόμων ή απώλεια βάρους στους ενήλικες και στα ζώα μείωση της παραγωγή γάλακτος και αυγών. Επιπλέον, καθιστούν τα ζώα πιο ευπαθή σε μολυσματικούς παράγοντες, λόγω της εξασθένησης του ανοσοποιητικού τους συστήματος, με τελικό αντίκτυπο στην ζωική παραγωγή, που υφίσταται σοβαρές οικονομικές απώλειες (Shane, 1994).

Η μέση θανατηφόρος δόση (LD50) για τα περισσότερα είδη κυμαίνεται μεταξύ 0,3 και 10-mg/kg σωματικού βάρους ύστερα από χορήγηση μέσω της πεπτικής οδού της AFB1. Τα διάφορα είδη των ζώων εκδηλώνουν ευαισθησία στην προσβολή τους με αφλατοξίνες διαφορετικό τρόπο και βαθμό. Τα είδη με την μεγαλύτερη ευαισθησία είναι

οι κόνικλοι, οι νεαρές πάπιες και οι χοίροι με τιμές LD50 0,30mg/kg, 0,43mg/kg και 0,60mg/kg, αντίστοιχα (Wild and Tuner, 2002). Αντίθετα, τα είδη με την λιγότερη ευαισθησία είναι οι ενήλικες αγελάδες, τα πρόβατα και οι αίγες που συνήθως εμφανίζουν χρόνιες αφλατοξινώσεις. Η μικρότερη ευαισθησία των μηρυκαστικών σε σχέση με τα μονογαστρικά ζώα αποδίδεται στη μερική διάσπαση που υφίστανται οι αφλατοξίνες από τη χλωρίδα της μεγάλης κοιλίας (Sassahara et al, 2005).

#### **2.4.5.4.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ**

Η δημόσια υγεία και η υγεία των καταναλωτών διατρέχουν σοβαρό κίνδυνο όταν καταναλωθούν τρόφιμα που προέρχονται από ζώα με χρόνιες ή υποκλινικές αφλατοξινώσεις (Berry, 1988).

Η οξεία μορφή της τοξίκωσης από αφλατοξίνες στον άνθρωπο εμφανίζεται περιστασιακά και ιδίως σε αναπτυσσόμενες χώρες, όπως η Αφρική και η Ασία. Η αιτία τις περισσότερες φορές αποδίδεται στην πρόσληψη μολυσμένης τροφής και κυρίως δημητριακών (π.χ. καλαμπόκι). Το 1990 στην Ασία, στη Μαλαισία, αναφέρεται ότι 40 άνθρωποι προσβλήθηκαν και 13 παιδιά πέθαναν λόγω της οξείας τοξίνωσης ύστερα από κατανάλωση ζυμαρικών μολυσμένων με αφλατοξίνες (Chao et al., 1991). Ακόμη ένα γεγονός οξείας αφλατοξίνωσης ήταν το 2004 στην Κένυα. Συγκεκριμένα, υπήρξε μόλυνση 317 ατόμων και θάνατος 125 μετά κατανάλωση γεύματος με αραβόσιτο που ήταν μολυσμένο με αφλατοξίνες σε συγκέντρωση που κυμαίνονταν στα 20 με 8000 μg/Kg (Morbidity and Mortality Weekly Report -MMWR 2004).

Ωστόσο, η συνηθισμένη μορφή που παρατηρείται στον άνθρωπο είναι η χρόνια. Αυτή οφείλεται στην μακροχρόνια κατανάλωση μικρών συγκεντρώσεων αφλατοξίνης. Η μορφή αυτή συνήθως αναφέρεται ότι μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση καρκίνου του ήπατος, σε χρόνιες ηπατίτιδες και στην κίρρωσή του. Ο ηπατικός καρκίνος αποτελεί έναν μείζονα παράγοντα θνητότητας σε Ασία και Αφρική (Armstrong, 1980). Επίσης, στα μέρη όπου οι κλιματολογικές συνθήκες είναι ευνοϊκές για την παραγωγή αφλατοξινών, η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του ήπατος είναι αυξημένη. Έχει αναφερθεί, ακόμη και πιθανή συνέργεια της ομάδας των αφλατοξινών ηπατίτιδας Β (HBV) στην εμφάνιση καρκίνου του ήπατος (Stoloff, 1983). Οι αφλατοξίνες στον άνθρωπο δύνανται να προκαλέσουν ανοσοκαταστολή (Williams et al., 2004) και πιθανώς να εμπλέκονται και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις, όπως το σύνδρομο Reyes και η νόσος Kwashiorkor (Gong et al., 2004; Turner et al., 2007).

Σε διάφορες *in vitro* μελέτες έχει αποδειχθεί ότι τόσο η AFB1 όσο και η AFM1 μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στη δομή του DNA, γονιδιακή μετάλλαξη, χρωματοσωμικές ανωμαλίες και κυτταρική μετάπλαση σε κύτταρα θηλαστικών (SCF, 1994). Ωστόσο, η τοξική αυτή δράση της AFM1 σε σύγκριση με την αντίστοιχη της AFB1 είναι κατά πολύ μικρότερη (Barnes, 1970; Lafont et al., 1989). Αυτό γίνεται φανερό και από το γεγονός ότι η μικρότερη δόση αφλατοξίνης B1 που δύναται να προκαλέσει καρκινογένεση σε πειραματόζωα είναι 0,1 μg/kg σωματικού βάρους ανά μέρα, ενώ το επιτρεπόμενο ημερήσιο όριο πρόσληψης από τον άνθρωπο δεν πρέπει να ξεπερνά τα 0,01 ng/kg βάρους σώματος ανά ημέρα (SCF, 1994).

Η επίδραση της αφλατοξίνης στην γονιμότητα των ανδρών μελετήθηκε από τους Ibeh et al. (1994). Στην έρευνα συμμετείχαν 50 γόνιμοι και 50 μη γόνιμοι άνδρες, από τους οποίους έγινε ανάλυση δείγματος αίματος για την ανίχνευση της αφλατοξίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το 40% των μη γόνιμων ανδρών ήταν θετικό για την αφλατοξίνη, και σε αυτούς παρατηρήθηκε υψηλότερο ποσοστό μορφολογικών ανωμαλιών των σπερματοζωαρίων, ενώ από τους γόνιμους μόνο το 8% ήταν θετικό.

Η επίδραση των αφλατοξινών κατά την κυοφορία, έχει διαπιστωθεί ο μεταβολισμός τους από το ήπαρ των εμβρύων (Wild et al., 1991). Επίσης έχει αναφερθεί και η ύπαρξη των αφλατοξινών στο μητρικό γάλα (Coulter J. et al., 1984; Galvano F. et al., 2008; Wild C. et al., 2004). Σημαντική έκθεση του εμβρύου κατά την εγκυμοσύνη οδήγησε σε αύξηση των γεννήσεων ελλειποβαρών μωρών (Abdulrazzaq et al., 2002).

#### **2.4.5.4.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΑ ΖΩΑ**

Γενικά, τα μηρυκαστικά είναι πιο ανθεκτικά στην κατανάλωση αφλατοξίνης από άλλα μονογαστρικά ζώα (Jouany et al., 2009). Τα γενικά κλινικά συμπτώματα που καταγράφονται συνήθως μετά από χρόνια κατανάλωση αφλατοξινών ή την πρόσληψή τους από ζώα σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι μειωμένη κατανάλωση τροφής, μειωμένος μεταβολισμός, μειωμένη ανάπτυξη και παραγωγή, μειωμένη ανοσία στα παράσιτα και μικρόβια, ρινική εκκένωση, δύσπνοια, βήχας, λήθαργος, ίκτερος και άλλα συμπτώματα όπως αιμορραγία στους μύες ή τις κοιλότητες του σώματος (Jacobsen et al., 1993; Diekman and Green, 1992; Clark et al., 1984). Η μόλυνση των ζωοτροφών από αφλατοξίνες δεν είναι ασυνήθιστη και η κατανάλωσή τους από ζώα συχνά οδηγεί στην εμφάνιση των παραπάνω γενικών συμπτωμάτων, λαμβάνοντας, σε ορισμένες περιπτώσεις, διαστάσεις της «επιδημίας» (Osweiler and Trampel 1985; Colvin et al., 1984; Hall et al., 1989). Οι Samarajeewa et al. (1975), διαπίστωσαν θανάτους αιγών νεαρής ηλικίας, όπου ο αριθμός τους ήταν μεγάλος, που οφείλονταν σε κατανάλωση μολυσμένης ζωοτροφής, με τη μορφή συμπυκνώματος, με αφλατοξίνη σε υψηλή συγκέντρωση. Τα ζώα διατρέφονταν με την τροφή αυτή περίπου 400 g την ημέρα για ένα χρονικό διάστημα 4 μηνών. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση στην τροφή, και ανιχνεύθηκε συγκέντρωση 0,15 μg αφλατοξίνης B1/g τροφής και 0,23 μg αφλατοξίνης G1/g τροφής, ενώ το ενδεχόμενο τοξίκωσης ή/και δηλητηριασμού από άλλο παράγοντα αποκλείστηκε. Τα νεκροτομικά στοιχεία φανέρωσαν εκτεταμένη βλάβη του ήπατος. Στην έρευνα αυτή, η ημερήσια κατανάλωση αφλατοξίνης ανέρχονταν στα 0.06 mg/ζώο, συγκέντρωση που θα μπορούσε να υπάρξει σε συνθήκες εκτροφής

Πολλοί ερευνητές αναφέρουν ότι παρατηρήθηκε μείωση του σωματικού βάρους σε νεαρά αναπτυσσόμενα ζώα (Πίνακας 2.3) ύστερα από χορήγηση αφλατοξινών. Αναφορικά, μείωση του σωματικού βάρους σε αίγες παρατηρήθηκε όταν τους χορηγήθηκε AFB1 (Miller et al., 1984; Clark et al., 1984), όπως μείωση του σωματικού βάρους, αλλά και της ημερήσιας αύξησης, παρατηρήθηκε και σε αμνούς μετά από χορήγηση αφλατοξίνης (Fernandez et al., 1996). Στην ίδια έρευνα παρατηρήθηκε μείωση του βάρους του ήπατος, ενώ και σε μετέπειτα έρευνα των Fernandez et al. (2000), επαναπαρατηρήθηκε η μείωση του σωματικού βάρους. Παρομοίως, σε έρευνα σε βοοειδή, συγκεκριμένα σε μόσχους, (Neathery et al., 1980) παρατηρήθηκε η μείωση του σωματικού βάρους και μείωση της πρόσληψης τροφής όταν τους χορηγήθηκε

αφλατοξίνη επί 21 ημέρες. Αντίθετα αποτελέσματα με τα προηγούμενα ευρήματα, παρατηρήθηκαν στην έρευνα των Battacone et al. (2003), όπου το σωματικό βάρος προβάτων αυξήθηκε ύστερα από την χορήγηση αφλατοξίνης.

**Πίνακας 2.3: Επίδραση των αφλατοξινών στο σωματικό βάρος και στις βιοχημικές παραμέτρους του αίματος διαφόρων ειδών (adapted from: Κουρουσέκος 2011)**

Είδος ζώου	Επίδραση	Χορηγούμενη ποσότητα αφλατοξίνης	Βιβλιογραφική αναφορά
Αίγα	* Σ.Β.**	0,1 mg/kg Σ.Β./ημ. για 34 ημ.	Miller και συν. (1984)
Αίγα	Σ.Β., † AST <sup>‡</sup>	0,1 mg/kg Σ.Β./ημ. για 34 ημ.	Clark και συν. (1984)
Αίγα	LDH <sup>‡</sup> , ALT <sup>‡</sup>	32 – 470 ppb	Bingol και συν. (2007)
Πρόβατο	Σ.Β., ALT & ALP***	128 μg/ζώο/ημ. για 14 ημ.	Battacone και συν. (2003)
Πρόβατο	Σ.Β.	2 ppm/ημ. για 37 ημ.	Fernandez και συν. (2000)
Πρόβατο	Σ.Β.	2,5 ppm/ημ. για 21 ημ.	Fernandez και συν. (1996)
Βοοειδή	Σ.Β.	5 ppm/ημ. για 21 ημ.	Neathery και συν. (1980)
Βοοειδή	όχι σημαντικές διαφορές ως προς την πρόσκτηση βάρους	0,5-2 μg/l γάλακτος/ημ. για 6 εβδ.	Van Dijk και συν. (1984)
Όρνιθα	Σ.Β.	0,5 και 1 mg/kg τροφής για 15 ημ.	Nageswara και συν. (1999)
Όρνιθα	AST και ALT	50 και 100 ppb	Oguz και συν. (2002)
Ορτύκι	Σ.Β.	5 και 10 μg/g τροφής για 15 ημ.	Doerr και Ottinger (1980)
Ορτύκι	AST και ALT	3 ppm/ημ. για 35 ημ.	Madheswaran και συν. (2004)
Ιπποειδή	δραστηριότητα ηπατικών ενζύμων	2 mg/kg Σ.Β./ημ. για 5 ημ.	Aller και συν. (1981)
Ιπποειδή	κυρίως αιμορραγική εντερίτιδα	2 mg/kg Σ.Β. άπαξ	Bortell και συν. (1983)
Κόνιλος	Σ.Β.	2 ppm/ημ./ζώο για 4 μήνες	Dimitri και συν. (1998)

\*: μείωση

†: αύξηση

‡ AST: ασπάρτική αμινοτρανσφεράση

\*\*\* ALP: αλκαλική φωσφατάση

\*\* Σ.Β.: σωματικό βάρος

‡ ALT: αλανινική αμινοτρανσφεράση

‡ LDH: γαλακτική δεϋδρογενάση

Οι αφλατοξίνες φαίνεται να επιδρούν και να επηρεάζουν της βιοχημικές παραμέτρους του αίματος. Όσες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για την επίδραση αυτή είχαν ως επίκεντρο ανάλυσης τις ηπατικές παραμέτρους, όπως την ALT (αλανική αμινοτρανσφεράση), την AST (ασπάρτική αμινοτρανσφεράση), την ALP (αλκαλική φωσφατάση) και την LDH (γαλακτική δεϋδρογονάση). Τα αποτελέσματα ποικίλουν μεταξύ των ερευνών, καθώς και ανάλογα του είδους του ζώου. Σχετικά με τα μικρά μηρυκαστικά, οι Clark et al., το 1984 παρατήρησαν αύξηση των τιμών της AST και καμία επίδραση στις τιμές της ALT και ALP ύστερα από χορήγηση αφλατοξίνης B1 σε τράγους. Αυξημένη δραστηριότητα της AST σε αίγες που λάμβαναν αφλατοξίνη παρατήρησαν και οι Maryamma και Sivadas το 1975, ενώ οι Battacone et al., το 2003 παρατήρησαν το αντίθετο αποτέλεσμα, δηλαδή αύξηση των τιμών ALT και ALP και καμία επίδραση σε AST, μετά από χορήγηση αφλατοξίνης σε προβατίνες. Ακόμη, σε έρευνα των Aller et al. το 1981 σε νεαρούς ίππους, παρουσιάστηκε αύξηση των περισσότερων ηπατικών ενζύμων, έπειτα από χορήγηση υψηλών δόσεων αφλατοξίνης (2 mg/Kg Σ.Β./ημέρα) για διάστημα 5 ημερών.

Η επίδραση των αφλατοξινών στο γενετικό σύστημα δεν έχει διευκρινιστεί επαρκώς. Οι αφλατοξίνες επιδρούν στο γεννητικό σύστημα των αρσενικών ζώων, όπου προκαλούν μεταβολή του βάρους και του μεγέθους των γεννητικών οργάνων, καθώς και διαταραχή της σπερματογένεσης. Αναφορικά το αποτέλεσμα χορήγησης αφλατοξίνης σε αρουραίους ήταν η μείωση του μεγέθους και βάρους των όρχεων και την μείωση της

συγκέντρωσης των οιστρογόνων στο αίμα. Ενώ σε εξαιρετικά υψηλές δόσεις πιθανόν να διακόπτει την σπερματογένεση ( Gopal et al., 1980 ). γονιμοποιήσουν. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνα των Hafez et al. (1982), που πραγματοποιήθηκε σε αρσενικούς βούβαλους, όταν τους χορηγήθηκαν αφλατοξίνες B και G εμφάνισαν μορφολογικές ανωμαλίες στο 54 % και μείωση του αριθμού των ζωντανών σπερματοζωαρίων. Η χορήγηση αφλατοξίνης B1 σε αλέκτορες προκάλεσε ατροφία όρχεων, μορφολογικές ανωμαλίες των σπερματοζωαρίων και απουσία της σπερματογένεσης (Ortatatli et al., 2002). Το θηλυκό γενετικό σύστημα έχει μελετηθεί ως προς την επίδραση της αφλατοξίνης στην λειτουργία, στην γενετήσια ωριμότητα και στην ανάπτυξη του εμβρύου. Σε ορτύκια η αφλατοξίνη παρατηρήθηκε ότι προκαλεί καθυστέρηση της γενετήσιας ωριμότητας και αναστολή της ανάπτυξης των ωοθηκών και των ωοθυλακίων ( Doerr and Ottiger, 1980). Οι Ibeh και Saxena (1997a) χορήγησαν αφλατοξίνη B1 σε θηλυκούς αρουραίους και παρατήρησαν αναστολή στην ανάπτυξη των ωοκυττάρων και των ωοθυλακίων, που αποδόθηκε στην μείωση της οιστραδιόλης και στην αύξηση της προγεστερόνης. Επίσης παρατήρησαν μείωση του μεγέθους και του βάρους των ωοθηκών. Παρά την συναγωνιστική δράση των μεταβολιτών της αφλατοξίνης B1, αφλατοξικόλη και M1, με τα οιστρογόνα για την σύνδεση στους υποδοχείς στην μήτρα (Blankenship et al., 1982; Kyreïn, 1974) και την πιθανή κατ' επέκταση επίδραση στην ωοθυλακιορρηξία, η δράση της οιστραδιόλης 17-β μειώνει σημαντικά την επίδραση της αφλατοξίνης στην αναστολή σύνθεσης DNA, RNA και πρωτεϊνών (Nishiyama and Kurebe, 1981). Οι αφλατοξίνες μεταφέρονται και στο έμβρυο, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση ανάπτυξης και τοξικολογικές αλλοιώσεις ( οίδημα, αιμορραγία κ.α) στα έμβρυα κρικετών ((Schmidt and Panciera, 1980), μορφολογικές ανωμαλίες, όπως εξεγκεφαλία, σε έμβρυα ποντικών (Arora et al., 1981). Επίσης η παρουσία αφλατοξίνης B1 στην διατροφή αγελάδων σχετίστηκε με την εμφάνιση αποβολών στο τελευταίο τρίτο της κυοφορίας, λόγω της δυσλειτουργίας του ήπατος των μητέρων (Ray et al., 1986).

#### **2.4.5.5 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ M1**

Μία από τις μυκοτοξίνες, η αφλατοξίνη M1 (AFM1) είναι ο υδροξυλιωμένος μεταβολίτης της αφλατοξίνης B1 (AFB1) που σχηματίζεται στο ήπαρ μέσω ενζύμων που σχετίζονται με το κυτόχρωμα P450 (CYP1a2, CYP3a4, CYP3a5) και μπορεί να βρεθεί σε γάλα ή γαλακτοκομικά προϊόντα που λαμβάνονται από ζωικό κεφάλαιο που έχει διατραφεί με μολυσμένη τροφή ( Galvano et al., 2001; Tajkarimi et al., 2007; Van Egmond, 1989). Η ενεργοποίηση δημιουργεί δύο είδη εποξειδίου, το AFB1-8,9-εξω-εποξείδιο και το AFB1-8,9-ενδο-εποξείδιο, και αρκετούς άλλους μεταβολίτες, συμπεριλαμβανομένης της αφλατοξίνης M1 (AFM1). Τα εποξείδια της αφλατοξίνης και η AFM1 είναι τοξικά. Το AFB1 εξω-εποξείδιο συνδέεται με το DNA προκαλώντας μεταλλαξιογόνες βλάβες (Turner PC et al., 2012).

Συγκεκριμένα, η AFM1 είναι ένας κύριος μεταβολίτης που παράγεται από το CYP1A2 και ανιχνεύεται συνήθως σε ανθρώπους και ζώα που εκτίθενται σε AFB1. Η AFM1 είναι η πιο καρκινογόνος από τους υδροξυλιωμένους μεταβολίτες που έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί όγκους στην πέστροφα και τους αρουραίους (Cullen et al., 1987; Slnhuber et al., 1974). Αυτό υποστηρίζεται από την ικανότητα δέσμευσης με το DNA της AFM1 που έχει αποδειχθεί σε αρουραίους, ποντίκια και χοίρους και έχει ακόμη

αναγνωριστεί ότι σχηματίζει ένα σύμπλοκο N7 γουανίνης παρόμοιο με της AFB1 (Egner et al., 2003; Lutz et al., 1980) . Η AFM1 βρίσκεται συνήθως στο γάλα των γαλακτοκομικών βοοειδών και των ανθρώπων, οδηγώντας σε πολλές πιθανές οδούς έκθεσης με τη διατροφή (Gionati et al., 2015). Η AFM1 απεκκρίνεται επίσης σε υψηλά επίπεδα στα ούρα μετά από έκθεση σε AFB1 και ως εκ τούτου έχει γίνει ένας επιπλέον βιοδείκτης της έκθεσης σε AFB1 (Ross et al., 1992). Η AFM1 ανιχνεύεται στο γάλα 12–24 ώρες μετά την πρώτη κατάποση AFB1, φτάνοντας σε υψηλό επίπεδο μετά από λίγες ημέρες. Μόλις ολοκληρωθεί η κατάποση της AFB1, η συγκέντρωση AFM1 στο γάλα μειώνεται σε μη ανιχνεύσιμο επίπεδο μετά από 72 ώρες (Van Egmond, 1989).

Το απορροφούμενο κλάσμα της AFB1 μετατρέπεται στο ήπαρ σε έναν αριθμό μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων των υδροξυ-μεταβολιτών AFM1, AFM2 (του ανάλογου μεταβολίτη της AFB2) και AFM4. Όλα οι AFM απεκκρίνονται με το γάλα, αλλά οι AFM2 και AFM4 εμφανίζονται στο γάλα σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις από το AFM1, επομένως δεν θεωρούνται, καθ' αυτό, ζητήματα προτεραιότητας. Η AFM1 είναι ένας κύριος μεταβολίτης AFB1 που εισέρχεται στη συστηματική κυκλοφορία ή είναι συζευγμένος στο ήπαρ με γλυκουρονικό οξύ και απεκκρίνεται μέσω της χολής και με τη σειρά της η AFM1 μπορεί να απεκκρίνεται μέσω των νεφρών ή να μεταφέρεται στο γάλα (Frazzoli et al., 2017).

Συνολικά, οι τοξικολογικοί κίνδυνοι της AFM1, ιδίως ηπατοτοξικότητα και ηπατοκαρκινογένεση (συμπεριλαμβανομένης της γονοτοξικότητας), είναι συγκρίσιμοι με εκείνους της μητρικής ένωσης, παρόλο που η AFM1 έχει χαμηλότερη καρκινογόνο ισχύ σε σύγκριση με το AFB1, δηλαδή, μία ή δύο τάξεις μεγέθους σε πειραματικές μελέτες (Henry SH, 2001 ), λαμβάνοντας υπόψη ότι το AFB1 κατατάσσεται μεταξύ των πιο ισχυρών καρκινογόνων, το AFM1 διατηρεί ακόμη καρκινογόνο δυναμικό που σίγουρα αξίζει να ανησυχεί.

Η εκκρινόμενη ποσότητα AFM1 στο γάλα αγελάδων γαλακτοπαραγωγής μπορεί να αντιπροσωπεύει τουλάχιστον το 1-2% του AFB1 που καταναλώνεται. Ωστόσο, διαμορφώνεται από διάφορους παράγοντες. Οι αγελάδες γαλακτοπαραγωγής υψηλής απόδοσης ενδέχεται να παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό μεταφοράς AFM1 στο γάλα, ακόμη και πάνω από το 6% του AFB1 που καταναλώνεται.

Οι άλλες επιδράσεις του AFTs-M1 περιλαμβάνουν βλάβη στο ήπαρ, μειωμένη παραγωγή γάλακτος, ανοσοκαταστολή και μειωμένη παροχή οξυγόνου στους ιστούς λόγω αναιμίας (Aydin et al., 2008), η οποία μειώνει την όρεξη και την ανάπτυξη στα γαλακτοκομικά βοοειδή (Akande et al., 2006 ).

#### **2.4.5.6 ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Μ1 ΣΤΑ ΖΩΪΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ**

Τα μονογαστρικά ζώα και τα πουλερικά όταν καταναλώσουν ζωοτροφές με AFB1, το μεγαλύτερο ποσοστό της παραγόμενης M1 ανευρίσκεται στο ήπαρ, στους νεφρούς, και στο μαστό, ενώ η συγκέντρωσή της στο κρέας είναι πολύ λιγότερη (Furtado et al., 1979; Fernadez et al., 1994). Το γεγονός αυτό, είναι και η αιτία που υπάρχουν λιγότερες έρευνες για ζωικά προϊόντα, όπως κρέας και αυγά, σε σχέση με τις αντίστοιχες στο γάλα και στα προϊόντα του.



Τα αποτελέσματα έρευνας που έλαβε χώρα στην Αίγυπτο το 1991 επιβεβαιώνει όσα λέχθηκαν προηγουμένως, καθώς σε κανένα από τα δείγματα προϊόντων (σύνολο 215) επεξεργασμένου και νωπού κρέατος δεν ανευρέθηκε συγκέντρωση αφλατοξίνης M1 (Aziz and Youssef, 1991). Πρέπει να τονιστεί ότι, η παρουσία αφλατοξίνης σε προϊόν κατεργασμένου κρέατος είναι πιθανό να οφείλεται στην προσθήκη μολυσμένων μπαχαρικών (El-Kady et al., 1995). Επιπλέον, οι μύκητες *A. flavus* και ο *A. parasiticus* έχουν την δυνατότητα να αναπτυχθούν και σε διάφορα προϊόντα κρέατος που υπόκεινται ζύμωση (Refai et al., 2003), όμως, τα επίπεδα συγκέντρωσης AFM1 στα προϊόντα αυτά είναι συνήθως <0,01 µg/kg, που κατά την άποψη των Rojas et al., θεωρούνται ότι είναι ασφαλή για τον καταναλωτή.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Βραζιλία το 1996, διαπιστώθηκε η παρουσία των αφλατοξινών στα αυγά (Scussel, 2004). Αποδείχθηκε ότι η αφλατοξίνη μεταφέρεται από τις τροφές στα αυγά των πτηνών σε αρκετά υψηλότερο ποσοστό σε σύγκριση προς εκείνα από τις ζωοτροφές στο γάλα, φτάνοντας για παράδειγμα στις χήνες στο 50% (Oliveira et al., 2000) και στα ορτύκια στο 33% (Oliveira et al., 2003). Συνήθως, όμως, το ποσοστό της παρουσίας της αφλατοξίνης που ανιχνεύεται στα αυγά είναι χαμηλό, επειδή τα πτηνά είναι ευαίσθητα και σε σύντομο χρονικό διάστημα εμφανίζουν συμπτώματα της αφλατοξίνωσης (Oliveira et al., 2003). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε μια πρόσφατη έρευνα που έγινε σε 80 δείγματα κρέατος και 40 δείγματα αυγών στην Ιορδανία το 2009, η AFM1 ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 30% και 20%, αντίστοιχα, με υψηλές τιμές μεταξύ 0.031-0.828 µg/Kg (Herzallah, 2009).

#### **2.4.5.7 ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ M1 ΣΤΟ ΓΑΛΑ & ΣΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΟΥ**

##### **2.4.5.7.1 ΠΑΡΟΥΣΙΑ M1 ΣΤΟ ΓΑΛΑ**

Το γάλα αποτελεί την κύρια πηγή πρόσληψης της αφλατοξίνης M1 για τον άνθρωπο. Η AFM1 ανιχνεύεται εντός 12 ωρών στο γάλα των γαλακτοπαραγωγών ζώων, από τα οποία είχε γίνει κατανάλωση τροφής με AFB1 (Iongh et al., 1964; Diaz et al., 2004).

Διάφοροι παράγοντες συμβάλουν στην μετατροπή της αφλατοξίνης B1, που βρίσκεται στις ζωοτροφές, σε M1 στο γάλα των αγελάδων (Masoero et al., 2007). Συνήθως, το ποσοστό μετατροπής είναι μεταξύ 1-3 % (Price et al., 1985; Frobish et al., 1986), αν και έχουν αναφερθεί ποσοστό μέχρι 6% (Veldman et al., 1992). Παρόμοια ποσοστά παρατηρούνται, επίσης, και σε άλλα γαλακτοπαραγωγικά ζώα, όπως το πρόβατο και η αίγα (Battacone et al., 2005). Μέσα σε 72 ώρες από την στιγμή που θα διακοπεί η μολυσμένη ζωοτροφή, η συγκέντρωση της AFM1 είναι μη ανιχνεύσιμη στο γάλα (Van Egmond et al., 1977). Οι επιπτώσεις στην υγεία των καταναλωτών από την πρόσληψη AFM1 μέσω του γάλακτος και των προϊόντων του, είναι πολύ σοβαρές (Galvano et al., 1996; 1998; 2001; Kim et al., 2000; Martins and Martins, 2004). Στην περίπτωση μικρών παιδιών, όπου το γάλα αποτελεί την βασική τους τροφή, παρατηρείται μειωμένη ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος αν επιβαρυνθούν με αφλατοξίνη (Galvano et al., 2001).

Το 1990 έως το 2000 διεξάχθηκε μια ερευνά μεγάλης κλίμακας, μεταξύ χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης, όπου πάρθηκαν 7259 δείγματα γάλακτος. Στο 96% των δειγμάτων βρέθηκε να περιέχουν AFM1 από 0,001-0,03 µg/kg (Codex Alimentarius, 2000). Σε νέα έρευνα που διήρκεσε από το 1999 έως το 2003 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Ασφάλειας των Τροφίμων (EFSA, 2004), πάρθηκαν 4.988 δείγματα γάλακτος χωρών της Ε.Ε.. Από αυτά μόνο το 0,06% των δειγμάτων είχε AFM1 μεγαλύτερη του ανώτερου επιτρεπτού ορίου των 0,05 µg/kg. Η συνολική συγκέντρωση της AFM1 κατά την συλλογή του γάλακτος σε ομαδικές δεξαμενές ήταν χαμηλότερη από εκείνη στις μεμονωμένες μονάδων παραγωγής. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι σε περίπτωση που η συγκέντρωση είναι αυξημένη σε κάποια από τις μεμονωμένες μονάδες, η συγκέντρωση της AFM1 στο επιβαρυσμένο γάλα θα αραιωθεί κατά πολύ όταν αναμιχθεί με την υπόλοιπη ποσότητα από άλλες μονάδες και εν τέλη η τελική συγκέντρωση της AFM1 είναι μηδαμινή. Σπάνια όμως ανιχνεύονται υψηλές συγκεντρώσεις AFM1 στο γάλα προς κατανάλωση (Piva et al., 1988).

#### **2.4.5.7.2 ΠΑΡΟΥΣΙΑ Μ1 ΣΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ**

Η παστερίωση ή η αποστείρωση που χρησιμοποιείται για την εξυγίανση του γάλακτος και των προϊόντων του από τα μικρόβια δεν είναι ικανή να μειώσει τα επίπεδα της αφλατοξίνης σε μεγάλο βαθμό. Μπορεί να βρεθεί AFM1 σε προϊόντα που έγιναν με γάλα μολυσμένο από αφλατοξίνη, καθώς η σταθερότητα της AFM1 κατά τη θερμική επεξεργασία του παραμένει σταθερή, ακόμα και στην κονιοποίηση που αναπτύσσονται πολύ υψηλές θερμοκρασίες (150°C) (Van Egmond et al., 1977; Wiseman και Marth, 1983; Govaris et al., 2002). Γίνεται έτσι κατανοητό ότι η διαδικασία της αποστείρωσης, που πραγματοποιείται στο γάλα και τα γαλακτοκομικά δεν προκαλεί σημαντική μείωση των επιπέδων AFM1.

Η κύρια πηγή που προσλαμβάνει ο άνθρωπος τις αφλατοξίνες είναι το τυρί. Αυτό οφείλεται στο ότι η AFM1 είναι συνδεδεμένη με τις καζεΐνες του γάλακτος, με αποτέλεσμα το παραγόμενο τυρί να έχει υψηλότερη συγκέντρωση της αφλατοξίνης από το γάλα που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του (Brackett and Marth, 1982; Galvano et al., 1996; Tekinsen and Tekinsen, 2005). Από μετρήσεις που έχουν πραγματοποιηθεί η συγκέντρωση της τοξίνης είναι τρεις φορές μεγαλύτερη στα μαλακά τυριά και πέντε φορές στα σκληρά τυριά από την AFM1 του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή τους (Yousef and Marth, 1989; Govaris et al., 2001). Η ποσότητα της AFM1 που θα μεταφερθεί από το επιβαρυσμένο γάλα στα τυριά, έχει αποδειχθεί ότι εξαρτάται από παράγοντες που σχετίζονται με την διαδικασία της παραγωγής (Blanco et al., 1988). Κατά την διαδικασία της τυροκόμησης το 40 με 60 % της AFM1 που υπάρχει στο γάλα παραμένει στο τυρί και το υπόλοιπο διαφεύγει στο τυρόγαλα (Dragacci et al., 1995). Η σύνδεση της AFM1 με την κ-καζεΐνη γίνεται με υδροφοβικούς δεσμούς και η πρωτεόλυση της κ-καζεΐνης κατά την ωρίμανση, μπορεί να την αποδεσμεύσει (Dosako et al., 1980; Brackett and Marth, 1982). Η απελευθέρωση της AFM1 διευκολύνεται κατά την ωρίμανση των τυριών λόγω των ελεύθερων λιπαρών οξέων που παράγονται από την οξείδωση του λίπους (Brackett and Marth, 1982). Για τον λόγο αυτό, τυριά που συντηρούνται σε άλμη όπως η φέτα, ένα μικρό ποσοστό της AFM1 μπορεί να διαφύγει από το τυρί στην άλμη. Θεωρείται όμως ότι η AFM1 είναι σχετικά σταθερή στα τυριά κατά την αποθήκευση και συντήρηση σε ψύξη (Galvano et al., 1996).

Δεν υπάρχουν αρκετές έρευνες για την σταθερότητα της AFM1 σε ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα. Έχει βρεθεί ότι στο αγελαδινό γιαούρτι η AFM1 μειώνεται από 17 με 22% σε σχέση με το ποσοστό που υπήρχε στο γάλα μετά την διαδικασία ζύμωσης (Hassanin, 1994; Govaris et al., 2002). Κατά την συντήρηση σε ψύξη η μείωση της AFM1 είναι 4-12% (Wiseman and Marth, 1983; Govaris et al., 2002), ενώ μεγαλύτερη μείωση παρατηρείται σε προϊόντα με pH < 4 από ότι σε pH 4-6. Οι Wiseman και Marth το 1983 αναφέρουν ότι παραμένει σταθερή η AFM1 στο ξινόγαλο κατά την συντήρηση σε ψύξη. Παράγοντες όπως η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων και η παραγωγή γαλακτικού οξέος ή άλλων προϊόντων ζύμωσης μπορούν να επηρεάσουν την σταθερότητα της AFM1 στο γιαούρτι (Pierides et al., 2000). Η παρουσία της AFM1 δε επηρεάζει την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο γιαούρτι εκτός από τον *Streptococcus thermophilus* όταν η συγκέντρωση της AFM1 είναι μεγαλύτερη από 0,10 µg/kg (Rasic et al., 1991; Govaris et al., 2002).

#### 2.4.5.8 ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ

Προκειμένου να περιορισθεί ο κίνδυνος αυτός, μεγάλος αριθμός χωρών έχουν θεσπίσει μέγιστα επιτρεπτά όρια (MRLs) της AFB1 στις ζωοτροφές και στο γάλα. Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει ορίσει ως MRL ή ΑΟΚ (ανώτατο όριο καταλοίπων) τα 0,05 µg/kg στο νοπό, στο θερμικά επεξεργασμένο και στο γάλα που προορίζεται για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων. Στην περίπτωση του γάλακτος που προορίζεται να καταναλωθεί από βρέφη, η νομοθεσία είναι ιδιαίτερα αυστηρή ορίζοντας ως ανώτερο όριο τα 0,025 µg/kg (Κανονισμός 1881/ 2006 ΕΚ). Όμως ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ, σε αντίθεση με την Ευρωπαϊκή Ένωση, ορίζει ως MRL για την AFM1 0,5 µg/kg στο πλήρες, στο γάλα χαμηλών λιπαρών και στο αποβουτυρωμένο γάλα (Food and Drug Administration of USA, FDA 1996). Στην περίπτωση των ζωοτροφών, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει ορίσει ως όριο τα 10 µg/kg για την παρουσία αφλατοξίνης B1 (European Food Safety Authority - EFSA 2004, EFSA 2009).

Πρέπει να αναφερθεί όμως ότι η παραγωγή γάλακτος και των προϊόντων του χωρίς αφλατοξίνη δεν είναι πάντοτε εφικτή (Galvano et al., 1996). Τα τυριά που παράγονται στην Ευρώπη, η AFM1 παρουσιάζεται σε χαμηλά επίπεδα (Galvano et al., 1996; Yargoglou et al., 2005). Στην Ελλάδα από τα 54 δείγματα φέτας που πάρθηκαν, κανένα δεν ήταν θετικό στην παρουσία της τοξίνης (Kaniou-Grigoriadou et al., 2005). Αντίθετα στην Αφρική, στην Ασία και στη Λατινική Αμερική έχουν εντοπιστεί υψηλά επίπεδα της AFM1 σε παραγόμενα τυριά. Στην Τουρκία διεξάχθηκε έρευνα το 2009 σε παραδοσιακό τυρί άλμης, ανιχνεύθηκε AFM1 σε επίπεδα πάνω από 50 ng/kg, σε 82,4% των δειγμάτων, ενώ σε παλαιότερη έρευνα το ποσοστό των δειγμάτων δεν ξεπερνούσε το 62% (Tekinsen and Tekinsen, 2005). Στο Ιράν εντοπίστηκε η μέγιστη τιμή της AFM1 να είναι 2,05 µg/kg στο 82,5 % των 96 δειγμάτων τυριού τύπου φέτας (Kamkar, 2005) ενώ στην Βραζιλία, εντοπίστηκε στα τυριά υψηλές τιμές AFM1, μέχρι και 6,920 µg/kg (Scussel, 2004). Επίσης, στην Αίγυπτο μετά από έρευνα που διεξάχθηκε σε τυριά παρουσιάστηκαν τιμές της AFM1 μέχρι 10 µg/kg (Shephard, 2003). Πρέπει να τονιστεί ότι τόσο στην Ιταλία (Galvano et al., 1998) όσο και στην Κορέα (Kim et al., 2000) έχουν καταγραφεί περιστατικά γιαουρτιού θετικά στην AFM1. Στην Πορτογαλία, σε 48 δείγματα από γιαούρτια με φράουλες εντοπίστηκε αυξημένο ποσοστό (54,1%) της AFM1 από τους Martins και Martins (2004). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι

μύκητες *A. flavus* και *A. parasiticus* που οφείλονται για την παραγωγή της AFB1 στα γαλακτοκομικά προϊόντα (επιφανειακά και εσωτερικά) δεν είναι πολύ συχνή ακόμα και στην περίπτωση των τυριών που ωριμάζουν με τη βοήθεια μυκήτων (Scott, 1989).

#### 2.4.5.9 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ & ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μεθοδολογίες για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των AF. Η βασική ανοσοχημική ανάλυση είναι η ευρέως διαδεδομένη ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA). Άλλες μεθοδολογίες βασίζουν την απόδοσή τους σε ηλεκτροχημικές και οπτικές αρχές όπως: χρωματογραφία, απορρόφηση UV, φασματομετρία, φθορισμός και δοκιμές ανοσοχημικής ανάλυσης. Οι προαναφερθείσες μέθοδοι απαιτούν καλά εξοπλισμένα εργαστήρια, εκπαιδευμένο προσωπικό, επιβλαβείς διαλύτες και αρκετές ώρες για την ολοκλήρωση μιας ανάλυσης. Νέες μέθοδοι για την ανίχνευση αφλατοξινών προσπαθούν να αποφύγουν αυτά τα μειονεκτήματα. Μεταξύ αυτών των νέων μεθόδων, μπορεί να βρεθεί: βιοαισθητήρες, ηλεκτροκινητική, ηλεκτροχημική μεταγωγή, αμπερομετρική ανίχνευση και προσροφητική απογύμνωση βολταμετρία. Κάθε μία από τις προαναφερθείσες μεθοδολογίες έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και περιορισμούς ανάλογα με την ευαισθησία, την ευκολία χρήσης και τη σχέση κόστους και αποτελεσματικότητας (Esprinoso et al., 2011) (εικόνα 2.8).

Method	Need for a label	Need for prior sample preparation	LOD	Multiple analysis	Need for skilled operator	Field usage
TLC densitometer		SPE	1–20 ng/Kg	Yes	Yes	No
HPTLC		Extraction only	Pictogram	yes	yes	No
HPLC		IAC or SPE		Yes	Yes	No
LC-MS/MS		Extraction only	0.8 μg/Kg	Yes	Yes	No
Fluorometer		IAC	5–5000 μg/Kg	Yes	Yes	No
FTIR			<10 μg/Kg	Yes	Yes	No
RIA	Radio isotope	Extraction only	1 μg/Kg	Yes	Yes	No
ELISA	Enzymes	Extraction only		Yes	Yes	No
Immunodipstick	Colloidal gold	Extraction only	5 μg/Kg	Yes	Yes	Yes
QCMs		Extraction only	0.01–10 ng/mL	Yes	Yes	No
SPR		Extraction only	3.0–98 ng/mL	Yes	Yes	No
OLWS		Extraction only	0.5–10 ng/mL	Yes	Yes	No
Electrochemical		Extraction only	2 μg/Kg	Yes	Yes	No
Electrochemical		Extraction only	1 femtomolar	Yes	Yes	No

**Εικόνα 2.8: Σύγκριση διαφορετικών μεθόδων ανάλυσης αφλατοξίνης (adapted from: Alex P. Wacoo et al., 2014)**

#### **2.4.5.9.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Η χρωματογραφία είναι μια από τις πιο δημοφιλείς μεθόδους για την ανάλυση μυκοτοξινών όπως οι αφλατοξίνες. Οι πιο κοινές τεχνικές χρωματογραφίας είναι η αέρια χρωματογραφία (GC), η υγρή χρωματογραφία (LC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Από αυτές τις μεθόδους, οι LC και HPLC είναι οι πιο χρησιμοποιούμενες και αποτελούν «gold standard» των αναλυτικών μεθόδων για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των αφλατοξινών στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές. Σε πολλές περιπτώσεις, ακολουθούνται από το στάδιο ανίχνευσης φθορισμού (Cavaliere et al., 2006). Οι LC, TLC και HPLC είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες ποσοτικές μέθοδοι στην έρευνα και την ρουτίνα ανάλυση των αφλατοξινών (Vosough et al., 2010). Αυτές οι τεχνικές προσφέρουν εξαιρετικές ευαισθησίες, αλλά συχνά απαιτούν εξειδικευμένους χειριστές, εκτεταμένη προεπεξεργασία δειγμάτων και ακριβό εξοπλισμό (Sapsford et al., 2006).

##### **2.4.5.9.1.1 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (GC)**

Στην αέρια χρωματογραφία, η κινητή φάση είναι ένα αέριο φορέας και η στατική φάση είναι ένα υγρό επικαλυμμένο σε αδρανή στερεά σωματίδια.. Το προς ανάλυση δείγμα εξατμίζεται σε αέρια φάση και μεταφέρεται μέσω της στάσιμης φάσης με αέριο φορέα. Τα διαφορετικά χημικά συστατικά του δείγματος κατανέμονται μεταξύ της κινητής φάσης και της στατικής φάσης. Μόλις επιτευχθεί διαχωρισμός, η ανίχνευση των πτητικών προϊόντων πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας είτε έναν ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) είτε έναν ανιχνευτή δέσμησης ηλεκτρονίων (ECD) και φασματομέτρο μάζας (MS). Η αέρια χρωματογραφία, ωστόσο, είναι λιγότερο συχνή στην εμπορική ανάλυση των αφλατοξινών λόγω της ύπαρξης άλλων φθηνότερων χρωματογραφικών μεθόδων. Εκτός αυτού, η αέρια χρωματογραφία απαιτεί επίσης ένα προκαταρκτικό στάδιο καθαρισμού πριν από την ανάλυση και επομένως περιορίζεται στην ανάλυση μερικών μυκοτοξινών, όπως τα Α-τριχοθηκένια και τα Β-τριχοθηκένια. Ακόμη και σε τέτοιες αναλύσεις, η GC έχει μειονεκτήματα όπως η μη γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης, οι αποκρίσεις μετατόπισης, τα φαινόμενα μνήμης από προηγούμενα δείγματα και η υψηλή διακύμανση της αναπαραγωγιμότητας και της επαναληψιμότητας (Wacoo et al., 2014).

##### **2.4.5.9.1.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (LC)**

Η LC είναι μέθοδος διαχωρισμού που προσφέρει καλή ευαισθησία, υψηλό δυναμικό εύρος, ευελιξία και συνθήκες μαλακού ιονισμού που επιτρέπουν την πρόσβαση στη μοριακή μάζα άθικτων βιολογικών μορίων. Η LC συνήθως συνδέεται με το στάδιο ανίχνευσης φθορισμού (FLD), την απορρόφηση UV και την αμπερομετρική ανίχνευση (Elizalde-González, 1998) με παραγοντοποίηση πριν τη στήλη ή παραγοντοποίηση μετά τη στήλη. Οι διαδικασίες εκχύλισης και καθαρισμού για ανάλυση αφλατοξινών βασίζονται συνήθως σε εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) με διαφορετικά απορροφητικά υλικά. Μια συγκεκριμένη περίπτωση SPE είναι στήλες ανοσοσυγγένειας. Έχουν γίνει βελτιώσεις, δημιουργώντας τεχνικές που βασίζονται σε LC, όπως: TLC και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) (Elizalde-González, 1998). Η LC σε συνδυασμό με το στάδιο φθορισμού χρησιμοποιούν τις ιδιότητες φθορισμού αφλατοξινών για να τις ποσοτικοποιήσουν. Έτσι, με τη βελτίωση αυτής της ιδιότητας μπορεί να αποκτηθεί καλύτερη ευαισθησία για την ανίχνευση αφλατοξίνης. Οι

πιο συνηθισμένες τεχνικές για τη βελτίωση των ιδιοτήτων φθορισμού είναι η χρήση παραγωγοποίησης προ-στήλης με τριφθορωτικό οξύ και παραγωγοποίηση μετά τη στήλη με ιώδιο ή βρώμιο (Elizalde-González, 1998). Έχουν γίνει άλλες μελέτες προκειμένου να επιτευχθεί ενίσχυση των εκπομπών φθορισμού των αφλατοξινών. Οι Franco et al. (1998), συνέλεξαν δεδομένα εκπομπών για AFQ1, AFM1, AFP1 σε διαλύτες που χρησιμοποιούνται συνήθως για τον διαχωρισμό χρωματογραφίας τους απουσία και παρουσία διαφορετικών κυκλοδεξτρινών. Ένα τέτοιο πείραμα έγινε για να εφαρμοστεί κυρίως σε υγρή χρωματογραφία.

#### **2.4.5.9.1.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (TLC)**

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους de Jongh et al. (1964) και έχει θεωρηθεί από τον AOAC ( Association of Official Analytical Chemist) ως μέθοδο επιλογής από το 1990. Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας είναι μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές διαχωρισμού στην ανάλυση αφλατοξινών. Αποτελείται από μια στατική φάση φτιαγμένη είτε από σίλικα είτε από αλουμίνα ή από κυτταρίνη ακινητοποιημένη σε αδρανές υλικό όπως γυαλί ή πλαστικό, που ονομάζεται «μήτρα». Η κινητή φάση αποτελείται από μείγμα μεθανόλης: ακετονιτρίλιου: νερού (V. Betina 1985, Wacoo et al., 2014) το οποίο μεταφέρει το δείγμα μαζί του και κινείται μέσω της σταθερής στατικής φάσης. Στην TLC, η κατανομή των αφλατοξινών μεταξύ των κινητών και στατικών φάσεων βασίζεται κυρίως σε διαφορές στη διαλυτότητα των αναλυτών στις δύο φάσεις. Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στον προσδιορισμό των αφλατοξινών σε διαφορετικά τρόφιμα (H. Gulyas, 1985; K. M. Abdel-Gawad and A. A. Zohri, 1993; Y. M. H. Younis and K. M. Malik, 2003) και για συγκεντρώσεις έως 1-20ppb αφλατοξινών (M. Trucksess et al., 1984). Το πλεονέκτημα της χρήσης της μεθόδου TLC είναι ότι μπορεί να ανιχνεύσει διάφορους τύπους μυκοτοξινών σε ένα μόνο δείγμα δοκιμής (I. Balzer et al., 1984; M. Trucksess et al., 1984). Ενώ η TLC έχει εξαιρετική ευαισθησία, απαιτεί εξειδικευμένο τεχνικό, προεπεξεργασία δείγματος και ακριβό εξοπλισμό( E. Papp et al., 2002). Επιπλέον, η TLC στερείται ακρίβειας λόγω συσσωρευμένων σφαλμάτων κατά την εφαρμογή δείγματος, την ανάπτυξη των πλακών και την ερμηνεία τους. Οι προσπάθειες βελτίωσής της οδήγησαν στην ανάπτυξη αυτοματοποιημένης μορφής TLC, που ονομάζεται χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC). Η HPTLC έκτοτε ξεπέρασε τα προβλήματα που σχετίζονται με τις συμβατικές τεχνικές TLC μέσω αυτοματοποίησης της εφαρμογής δείγματος, ανάπτυξης και ερμηνείας των πλακών. Δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι επί του παρόντος το HPTLC είναι μια από τις πιο αποτελεσματικές και ακριβείς μεθόδους στην ανάλυση αφλατοξινών ( J. Ramesh et al., 2013; S. Nawaz et al., 1992). Παρ' όλα αυτά, η απαίτηση για εξειδικευμένους χειριστές, το κόστος του εξοπλισμού σε συνδυασμό με τον όγκο του, και η εκτεταμένη προεπεξεργασία δειγμάτων περιορίζουν την HPTLC στο εργαστήριο και επομένως δεν εφαρμόζεται σε καταστάσεις καθημερινότητας.

#### 2.4.5.9.1.4 ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (HPLC)

Όπως προαναφέρθηκε, η HPLC είναι μια από τις πιο κοινές μεθόδους για τον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των αφλατοξινών στα τρόφιμα. Έχει χρησιμοποιηθεί από κοινού με τεχνικές όπως απορρόφηση UV, φθορισμός, φασματομετρία μάζας και αμπερομετρικούς ανιχνευτές. Elizalde-González et al. (1998), ανέλυσαν τις αφλατοξίνες B1, B2, G1 και G2 με βάση την HPLC και την αμπερομετρική ανίχνευση και ανέφεραν ότι είναι δυνατόν να ανιχνευθούν 5 ng και των τεσσάρων αφλατοξινών. Αυτή η προτεινόμενη μέθοδος συνιστάται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της λιγότερο τοξικής αφλατοξίνης B2, η οποία παρουσιάζεται στους καρπούς. Οι Quinto et al. (2009) πρότεινε μια νέα μέθοδο για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2 σε τρόφιμα δημητριακών. Αυτή η μέθοδος βασίζεται σε μικροεκχύλιση στερεάς φάσης σε συνδυασμό με HPLC και φωτοχημική παραγοντοποίηση μετά τη στήλη για τη βελτίωση του φθορισμού των αναλυτών και της ανίχνευσης φθορισμού. Μια τέτοια μέθοδος συγκρίνεται γρήγορα με την πλήρη αναλυτική διαδικασία που χρησιμοποιεί στήλη ανοσοσυγγένειας. Ωστόσο, η ευαισθησία του είναι κάτω από τα νομικά όρια. Οι Vosugh et al. (2009) παρουσιάζουν μια εργασία που χρησιμοποιεί HPLC σε συνδυασμό με ανιχνευτή συστοιχιών διόδων (DAD) και έναν επαναληπτικό αλγόριθμο δεύτερης τάξης που ονομάζεται ανάλυση παράλληλων παραγόντων (PARAFAC). Μια τέτοια μέθοδος χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2 σε φιστίκια, αυτή η εργασία χρησιμοποιεί επίσης ένα στάδιο εκχύλισης στερεάς φάσης ως διαδικασία καθαρισμού. Οι Manneta et al. (2005) παρουσιάζουν μια νέα μέθοδο με ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιώντας το υπεροβρωμιούχο υδροβρωμικό πυριδίνιο ως παράγοντα παραγοντοποίησης μετά τη στήλη για τον προσδιορισμό της αφλατοξίνης M1 στο γάλα και το τυρί. Τα όρια ανίχνευσης που ελήφθησαν ήταν 1 ng/kg για γάλα και 5 ng/kg για τυρί που είναι 50 φορές χαμηλότερα από το μέγιστο επίπεδο καταλοίπων (MRL) για AFM1 στο γάλα και 40 φορές από το MRL για AFM1 σε τυρί που καθορίστηκε από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα.

Μια ενδιαφέρουσα εφαρμογή της HPLC είναι ο συνδυασμός ακινητοποιημένου ενζυμικού αντιδραστήρα (IMER) σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε απευθείας σύνδεση. Αυτός ο συνδυασμός επιτρέπει την επιλεκτικότητα, την ταχύτητα και τη μη καταστροφική αναπαραγωγιμότητα, αυτού του χρωματογραφικού συστήματος, να συνδυαστεί με την ειδικότητα και την ευαισθησία για μια ενζυματική αντίδραση (Girelli & Mattei, 2005). Η παραγωγοποίηση με φθοροφόρο ενισχύει τον φυσικό φθορισμό των αφλατοξινών και βελτιώνει την ανιχνευσιμότητα. Η προσέγγιση αυτή πριν τη στήλη χρησιμοποιεί τον σχηματισμό των αντίστοιχων ημιακετάλων χρησιμοποιώντας τριφθοροοξικό οξύ (TFA), ενώ η μετα-στήλη χρησιμοποιεί είτε βρωμίωση από ηλεκτροχημικό κύτταρο επιπλέον του βρωμιούχου, ή υπερβρωμιούχο υδροβρωμιούχο πυριδίνιο, για την κινητή φάση και το σχηματισμό ένα παράγωγου ιωδίου.

Η παρούσα τάση είναι η χρήση ανιχνευτών μάζας στους διαφορετικούς τύπους και διαμορφώσεις της HPLC. Αυτό οφείλεται στην καθολικότητα, επιλεκτικότητα και ευαισθησία της ανίχνευσης που παρέχουν (Alcaide-Molina, 2009).

#### 2.4.5.9.2 ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι ανοσοχημικές τεχνικές βασίζονται στην εξειδίκευση της σύνδεσης μεταξύ αντισωμάτων και αντιγόνων. Η υψηλή συγγένεια και εξειδίκευση των αντισωμάτων για αντιγόνα έχουν χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη των διαφόρων ανοσοχημικών μεθόδων. Η δημοτικότητα των τεχνικών που βασίζονται στα αντισώματα-αντιγόνα, από την ανάπτυξή τους στα τέλη της δεκαετίας του 1970 (D. Babu, 2010) οφείλεται στο υψηλό επίπεδο εξειδίκευσης και ευαισθησίας τους ακόμη και παρουσία μολυσματικών υλικών. Εκτός αυτού, οι ανοσοχημικές μέθοδοι δεν απαιτούν εξειδικευμένο και πολύ εκπαιδευμένο προσωπικό για την αντιμετώπιση προβλημάτων σε περίπτωση προβλημάτων κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού. Έχουν λιγότερη ένταση εργασίας και καταναλώνουν λιγότερο χρόνο, από την άποψη των οποίων προτιμώνται τόσο οι χρωματογραφικές όσο και οι φασματοφωτομετρικές τεχνικές. Οι κύριες ανοσοχημικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση αφλατοξινών περιλαμβάνουν ραδιοανοσοπροσδιορισμού (RIA), ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA), δοκιμασία στήλης ανοσοσυγγένειας (ICA) και ανοσοαισθητήρες

##### 2.4.5.9.2.1 ΡΑΔΙΟΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ (RIA)

Η τεχνική ραδιοανοσοπροσδιορισμού βασίζεται στην αρχή της ανταγωνιστικής δέσμευσης μεταξύ ενός ραδιενεργού σημασμένου αντιγόνου και ενός μη ραδιενεργού αντιγόνου. Το ραδιενεργό-επισημασμένο αντιγόνο ανταγωνίζεται με μη επισημασμένο μη ραδιενεργό αντιγόνο για έναν σταθερό αριθμό αντισωμάτων ή θέσεων σύνδεσης αντιγόνου στο ίδιο αντίσωμα (S.A. Berson και R.S. Yalow, 1968). Μια γνωστή ποσότητα επισημασμένου αντιγόνου και μια άγνωστη ποσότητα μη επισημασμένου αντιγόνου από πρότυπα αντιδρούν ανταγωνιστικά με μια γνωστή και περιοριστική ποσότητα του αντισώματος. Οι ποσότητες του επισημασμένου αντιγόνου είναι αντιστρόφως ανάλογες με την ποσότητα του μη επισημασμένου αντιγόνου στο δείγμα (D.S. Skelley et al., 1973). Η RIA ήταν η πρώτη τεχνική ανοσοδοκιμασίας που αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε στην ανίχνευση ινσουλίνης στο ανθρώπινο αίμα (P. Rauch et al., 1987). Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των αφλατοξινών σε δείγματα τροφίμων. Οι Langone και van Vunakis (1976) ανέφεραν τη χρήση τεχνικής ραδιοανοσοπροσδιορισμού στερεάς φάσης στον προσδιορισμό της αφλατοξίνης B1 στο φιστίκι και επιτεύχθηκε ένα όριο ανίχνευσης 1 μg/kg. Ομοίως, οι ραδιοανοσοδοκιμασίες έχουν χρησιμοποιηθεί για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων αφλατοξίνης B1 (S.Tsuboi et al., 1984) και των επιπέδων αφλατοξίνης M1 (P.Rauch et al., 1987). Το κύριο πλεονέκτημα του RIA είναι η ικανότητα εκτέλεσης πολλαπλών αναλύσεων ταυτόχρονα με υψηλά επίπεδα ευαισθησίας και ειδικότητας (T.C. Tseng et al., 1989). Ωστόσο, η μέθοδος αυτή πάσχει από ορισμένα μειονεκτήματα: (α) απαιτεί ένα αντιγόνο σε «καθαρή» κατάσταση, (β) η χρήση ραδιενεργού ισότοπου ως δείκτη σχετίζεται με πιθανούς κινδύνους για την υγεία και (γ) έχει προβλήματα που σχετίζονται με την αποθήκευση και διάθεση των ραδιενεργών αποβλήτων χαμηλού επιπέδου (R. Twyman, 2005). Αυτά τα μειονεκτήματα έχουν περιορίσει τη συχνή χρήση του RIA στην καθημερινή ανάλυση των αφλατοξινών.



#### **2.4.5.9.2.2 ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΦΗΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ (ELISA)**

Η αρχή των ενζυμικών ανοσοπροσδιορισμών (EIA) είναι ουσιαστικά η ίδια με τις άλλες ανοσοχημικές μεθόδους. Δηλαδή, βασίζεται στην εξειδίκευση των αντισωμάτων για τα αντιγόνα και η ευαισθησία της ανάλυσης αυξάνεται επισημαίνοντας είτε τα αντισώματα είτε τα αντιγόνα με ένα ένζυμο που μπορεί εύκολα να προσδιοριστεί με τη χρήση συγκεκριμένων υποστρωμάτων. Ως εκ τούτου, ένα αντίσωμα ακινητοποιημένο πάνω σε ένα στερεό υπόστρωμα μπορεί να συλλάβει ένα μη επισημασμένο αντιγόνο στην αναλύσιμη ουσία, το οποίο στη συνέχεια ανιχνεύεται από ένα επισημασμένο αντίσωμα (R.Twyman, 2005). Η αρχή της EIA / ELISA έχει δημιουργήσει μια ολόκληρη σειρά μορφών δοκιμής (R.M. Lequin, 2005). Για παράδειγμα, η ανταγωνιστική μορφή ενζύμων ανοσοπροσδιορισμών όχι μόνο είναι απλή στην εκτέλεση αλλά παρέχει ένα χρήσιμο μέτρο συγκέντρωσης αντιγόνου ή αντισώματος και είναι επίσης εξαιρετικά ευαίσθητη. Για το λόγο αυτό, ο ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός (EIA) και τυπικά η ELISA έχουν γίνει μέθοδοι επιλογής για ιατρικά διαγνωστικά εργαστήρια, ερευνητικά κέντρα και ρυθμιστικοί φορείς για την αξιολόγηση της ποιότητας και τη δοκιμή επάρκειας, μεταξύ άλλων.

Η τεχνική ELISA χρησιμοποιείται επί του παρόντος για την ανίχνευση αφλατοξινών σε γεωργικά προϊόντα και χρησιμοποιούνται πολλά εμπορικά διαθέσιμα kit ELISA με βάση μια ανταγωνιστική μορφή ανοσοπροσδιορισμού.

Η μέθοδος ELISA προσφέρει ορισμένα πλεονεκτήματα: (α) είναι δυνατή η εκτέλεση της δοκιμής σε πλατφόρμα ανάλυσης 96 φρεατίων, πράγμα που σημαίνει ότι μεγάλος αριθμός δειγμάτων μπορεί να αναλυθεί ταυτόχρονα, (β) Τα kit ELISA είναι φθηνά και εύχρηστα και δεν απαιτούν εκτεταμένο «καθαρισμό» δείγματος και (γ) δεν υπάρχουν εγγενείς κίνδυνοι για την υγεία που σχετίζονται με τους ενζυμικούς δείκτες, όπως για τα ισότοπα. Ωστόσο, η τεχνική ELISA απαιτεί πολλαπλά στάδια πλύσης, τα οποία μπορεί μερικές φορές να αποδειχθούν όχι μόνο επίπονα αλλά και χρονοβόρα.

#### **2.4.5.9.2.3 ΑΝΟΣΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ**

Ένας ανοσοαισθητήρας είναι ένας βιοαισθητήρας που χρησιμοποιεί ένα είδος αντιγόνου ή αντισώματος ως συστατικά βιολογικής αναγνώρισης σε συνδυασμένο με έναν μορφοτροπέα σήματος όπως γραφίτη, χρυσό και άνθρακα που βοηθούν στην ανίχνευση της δέσμευσης των συμπληρωματικών ειδών (C.L. Morgan et al., 1996; F. Ricci et al., 2007). Όσον αφορά τον τύπο μεταγωγής σήματος κατά τη χρήση, οι ανοσοαισθητήρες μπορούν να ομαδοποιηθούν σε πιεζοηλεκτρικούς, οπτικούς και ηλεκτροχημικούς αισθητήρες (P.B. Lurpa et al., 2001).

#### **2.4.5.10 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΙΩΣΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ & ΤΗΣ Μ1**

Οι προστατευτικές παρεμβάσεις έναντι της έκθεσης της αφλατοξίνης σε οικονομικά αναπτυσσόμενες χώρες μπορούν να λάβουν πολλές μορφές. Είναι αξιωματικό ότι καθώς αυξάνεται η οικονομική ανάπτυξη, αυξάνεται επίσης η ικανότητα ενός πληθυσμού να υιοθετεί μια πιο ποικίλη διατροφή. Αυτή η διατροφική ποικιλομορφία συνήθως οδηγεί

σε μείωση των εκθέσεων αφλατοξίνης. Προφανώς, η οικονομική ανάπτυξη μιας χώρας και των περιφερειών της εντός των χωρών μπορεί να προχωρήσει με πολύ αργό ρυθμό, ακόμη και να γνωρίσει ύφεση. Ως εκ τούτου, απαιτούνται στρατηγικές παρέμβασης κατά τη διάρκεια των ενδιάμεσων χρόνων για τη μείωση των κινδύνων που σχετίζονται με την αναπόφευκτη έκθεση στην αφλατοξίνη. Οποιοσδήποτε στρατηγικές παρέμβασης πρέπει να δοκιμάζονται αυστηρά και να επικυρώνονται χρησιμοποιώντας σχέδια κλινικών δοκιμών με τους βιοδείκτες της αφλατοξίνης που χρησιμεύουν ως αντικειμενικά τελικά σημεία. Έτσι ώστε, να ενισχυθεί η πρόληψη της δημόσιας υγείας.

Η πρωτοβάθμια πρόληψη, έχει σαν στόχο να μειωθεί η έκθεση σε αφλατοξίνες στη διατροφή. Έτσι, ένα φάσμα παρεμβάσεων μπορεί να περιλαμβάνει φύτευση ανθεκτικών σε παράσιτα ποικιλιών βασικών καλλιεργειών, απόπειρα μείωσης της ανάπτυξης μούχλας σε συγκομιδές, βελτίωση μεθόδων αποθήκευσης μετά τη συγκομιδή και χρήση παραγόντων παγίδευσης που εμποδίζουν την αναπόφευκτη πρόσληψη αφλατοξινών. Στην δευτεροβάθμια πρόληψη, ένας στόχος είναι να ρυθμιστεί ο μεταβολισμός των ήδη υπάρχουσων στα προϊόντα αφλατοξινών για να ενισχυθούν οι διαδικασίες αποτοξίνωσης, μειώνοντας έτσι τις εσωτερικές δόσεις και τον επακόλουθο κίνδυνο. Υπάρχει ενεργή έρευνα για την ανάπτυξη στελεχών ανθεκτικών σε μούχλα και των γενετικών χειρισμών των μυκήτων αυτών για τη μείωση της παραγωγής αφλατοξίνης (Menkir et al., 2006; Yu et al., 2005).

Η κλιματική αλλαγή παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή της αφλατοξίνης από το *Aspergillus* σε καλλιέργειες τροφίμων (Paterson and Lima, 2010-2011; Magan et al., 2011; Wu F. et al., 2011; Wu S. et al., 2011). Η κλιματική αλλαγή επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών μυκοτοξικών ειδών και των τοξινών που παράγονται από αυτά σε τρόφιμα και ζωοτροφές (Magan et al., 2010; Paterson and Lima, 2012). Οι αλλαγές στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης των ρυθμιστικών γονιδίων (aflR και aflS) και της παραγωγής αφλατοξίνης σε *A. flavus* και *A. parasiticus* (Schmidt-Heydt et al., 2010; 2011). Ένας καλός συσχετισμός μεταξύ της έκφρασης ενός πρώιμου δομικού γονιδίου (aflD) και της παραγωγής AFB1 έχει αναφερθεί από τους Abdel-Hadi et al. (2010). Η θερμοκρασία αλληλοεπιδρά με την «ενεργότητα» του ύδατος (aw) και επηρεάζει την αναλογία ρυθμιστικών γονιδίων (aflR/aflS), η οποία είναι άμεσα ανάλογη με την παραγωγή AFB1 (Schmidt-Heydt et al., 2009; 2010). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ενεργότητας ύδατος και της θερμοκρασίας έχουν εμφανή επίδραση στο *Aspergillus* spp. και παραγωγή αφλατοξίνης (Sanchis and Magan, 2004; Magan and Aldred, 2007). Η αύξηση της θερμοκρασίας στους 37°C και η πίεση του νερού μειώνουν σημαντικά την παραγωγή της AFB1 που παράγεται, παρά την ανάπτυξη του *A. flavus* υπό αυτές τις συνθήκες. Η προσθήκη CO<sub>2</sub> υπό την ίδια θερμοκρασία και ενεργότητα ύδατος ενισχύει την παραγωγή AFB1 (Medina et al., 2014). Σύμφωνα με τους Gallo et al. (2016), η παραγωγή βιομάζας μυκήτων και AFB1 ήταν υψηλότερη στους 28°C και 0,96 aw, ενώ δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη μυκήτων ή παραγωγή AFB1 στους 20 ° C με τιμές aw 0,90 και 0,93. Δεν παρατηρήθηκε επίσης παραγωγή AFB1 στους 37°C. Η ποσοτική PCR αντίστροφης μεταγραφάσης αποκάλυψε επίσης ότι τα ρυθμιστικά γονίδια aflR και aflS εκφράστηκαν σε υψηλό βαθμό στους 28°C, ενώ η χαμηλότερη έκφραση παρατηρήθηκε στους 20 και 37°C, υποδηλώνοντας ότι η θερμοκρασία παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση γονιδίων και στην παραγωγή αφλατοξίνης (Gallo et al., 2016)

#### 2.4.5.10.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΙΩΣΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Μ1 ΣΤΟ ΓΑΛΑ

Πιστεύεται ότι η πρόληψη και ο έλεγχος της ανάπτυξης μυκήτων είναι μια σημαντική τεχνική για τη μείωση της περιεκτικότητας AFB-1 στο γάλα. Υπάρχει μια γραμμική συσχέτιση μεταξύ AFB-1 στις ζωοτροφές και της ποσότητας AFB-1 στο γάλα (Galvano F. et al., 2001). Για να αποφευχθεί η μόλυνση του γαλακτος, τα γαλακτοκομικά ζώα πρέπει να εμβολιάζονται κατά των AF, ιδίως AFB-1. Ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι ο εμβολιασμός μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο μόλυνσης ζωικών/γαλακτοκομικών προϊόντων από AF. Τα επίπεδα των αντισωμάτων αντί-AFB-1 σε εμβολιασμένες δαμαλίδες μειώνονται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και μετά τον τοκετό και στην αρχή του κύκλου παραγωγής γάλακτος, επιστρέφουν στο προηγούμενο εύρος. Τέτοιες αλλαγές στα επίπεδα αντισωμάτων αντί-AFB-1 μετά τον εμβολιασμό μπορεί να αποδείξουν την αποτελεσματικότητα αυτής της στρατηγικής (Abdul-Baki AA and Anderson JD, 1973; Mulunda M et al., 2013). Μια άλλη πολύτιμη μέθοδος για τον έλεγχο της AFB-1 και κατά συνέπεια της AFM-1 είναι η αναστολή της αρχικής μόλυνσης των ζωοτροφών που καταναλώνουν τα γαλακτοπαραγωγά βοοειδή. Σε μια έρευνα, τονίστηκε ότι η χρήση μολυσμένου τμήματος των καλλιεργειών πρέπει να απαγορευτεί και τέτοιες καλλιέργειες πρέπει να αφαιρεθούν κατά τη διαδικασία συγκομιδής. Επιπλέον, ο τόπος, η θερμοκρασία και η υγρασία των αποθηκών πρέπει να ελέγχονται δεδομένου ότι μπορούν να προκαλέσουν την ανάπτυξη μυκήτων στις αποθήκες (Grenier B. and Applegate T., 2013). Αναφέρεται ότι η αναστολή της μόλυνσης μέσω του ελέγχου ζωοτροφών είναι πολύ σημαντική. Η ποιότητα των ζωοτροφών επηρεάζει την περιεκτικότητα σε AF στο παραγόμενο γάλα. Κατά την παραγωγή της καλλιέργειας στο αγρόκτημα και την αποθήκευση προϊόντων σε παραδοσιακές ή βιομηχανικές δεξαμενές, πρέπει να ελέγχονται τα όργανα παρακολούθησης και τα θέματα υγιεινής (Mohamadi H. and Alizadeh M., 2010).

Χρήση προβιοτικών για τον βιολογικό έλεγχο έχει αναφερθεί ότι μπορούν να μειώσουν και να αποτρέψουν την ανάπτυξη των μυκήτων και των αφλατοξινών στην τροφή (Kamkar A., 2008; Farnia P. et al., 2004). Τα πιο σημαντικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά ανήκουν σε βακτηριακά γένη συμπεριλαμβανομένων των *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Bifidobacteria* και *Burkholderia*. Τα εμπορικά στελέχη μπορούν να μειώσουν τα περιεχόμενα AFM - 1 σε αλατούχο διάλυμα, φωσφορικό άλας, γάλα και γιαούρτι. Μερικές ζύμες όπως, είδη *Saccharomyces* και μη τοξικογόνα στελέχη *Aspergillus*, έχουν χρησιμοποιηθεί ως ανταγωνιστικοί παράγοντες βιολογικού ελέγχου (Gratz S. et al., 2004). Επίσης, τα προβιοτικά φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και κατά την αποθήκευση. Σε έρευνα όπου χρησιμοποιήθηκε ο *Saccharomyces kefir* και *Lactobacillus casei* για την μείωση AFM-1 στο γάλα, παρατηρήθηκε η θετική επίδραση των μικροοργανισμών για την εξάλειψη υψηλών επιπέδων AFM-1 στο γάλα (Hwang KT et al., 2005). Αποδεικνύεται ότι η σύνδεση του AFM-1 σε συστατικά κυτταρικού τοιχώματος προβιοτικών μικροοργανισμών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της τοξίνης στο γάλα. Η ενζυμική αποδόμηση του AFM-1 από είδη *Lactobacillus*, *Pseudomonas* και *Burkholderia* μπορεί επίσης να αναστείλει την ανάπτυξη και παραγωγή μυκοτοξινικών μυκήτων (Kamkar A., 2008). Το *Saccharomyces cerevisiae* είναι μια από τις ζύμες που μπορεί να δεσμευτεί αποτελεσματικά με AFM-1. Μεταξύ των βακτηρίων, το *Lactobacillus rhamnosus* L60 και το *Lactobacillus fermentum* L23 έχουν υψηλή ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη μυκηλίου των αφλατογενετικών στελεχών *Aspergillus* και να μειώνουν την παραγωγή AFB-1 (Merza MA et al., 2011).

Για την αποφυγή της απορρόφησης από το γαστρεντερικό σωλήνα των αφλατοξινών και κατ' επέκταση και τον περιορισμό της εξάπλωσης της τοξίνης στους ιστούς, μπορεί να γίνει η χρήση δεσμευτικών παραγόντων στην τροφή ή ξεχωριστά σε μεμονωμένα γεύματα μέσα στην μέρα. Τέτοιοι παράγοντες είναι ο μπετονίτης, ο βερμικουλίτης, το ένυδρο πυριτικό αργίλιο νατρίου (HSCAS) και ο ενεργός άνθρακας. Τα μυκοδεσμευτικά μπορούν να μειώσουν τα παράγωγα των αφλατοξινών στο γάλα λόγω της μεγάλης ποικιλίας και της ικανότητάς τους να συνδέονται με AFM - 1 σε στέρεα κατάσταση. Τέτοιες ενώσεις μπορεί να επηρεάζονται από το pH και τη θερμοκρασία

Η χημική προσέγγιση για την μείωση της αφλατοξίνης M1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μείωση, καταστροφή ή απενεργοποίηση της AF στο γάλα. Περιλαμβάνουν τεχνικές αμμωνίας, όξινης επεξεργασίας, οξειδωσης και αναγωγής ( αμμωνία και υπεροξειδίου του υδρογόνου). Υπάρχουν πολλά ζητήματα και κίνδυνοι που σχετίζονται με αυτές τις μεθόδους. Πρώτον, είναι δύσκολο να αποτοξινωθεί η AF χωρίς να μειωθεί η θρεπτική αξία και η γευστικότητα του τροφίμου. Επιπλέον, ένας αριθμός παραμέτρων όπως ο χρόνος αντίδρασης, η θερμοκρασία και η υγρασία πρέπει να ελέγχονται. Επίσης, ορισμένες απαραίτητες πρόσθετες θεραπείες μπορεί να χρειαστούν που είναι δαπανηρές και χρονοβόρες και μπορεί να παραχθούν τοξικά υποπροϊόντα (Salminen S. et al., 2010).

Μια ενδιαφέρουσα τεχνική για τη μείωση των τοξινών, ειδικά AFM-1 στα τρόφιμα, είναι η χρήση φυτικών εκχυλισμάτων. Ορισμένα φυτά όπως το μπρόκολο, το σκόρδο, το μαύρο κύμινο και η κουρκουμίνη έχουν αναφερθεί ότι είναι αποτελεσματικά για τη μείωση των AF. Τα αναφερόμενα εκχυλίσματα μπορεί επίσης να έχουν ανασταλτική επίδραση στις AF. Τα εκχυλίσματα είναι επίσης γνωστά ως αντιοξειδωτικά, αντιμυκητιασικά και αντιφλεγμονώδη μέσα, επειδή είναι ικανά να αναστέλλουν μόλυνση ή μόρια που προκαλούν φλεγμονή (Kazemi Darsanaki R., 2017).

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να βοηθήσουν το ανθρώπινο σώμα να αποτοξινώσει τις τοξίνες στο ήπαρ και σε άλλα κύτταρα και, κατά συνέπεια, να μειώσει την εμφάνιση μυκοτοξίκωσης. Αντιοξειδωτικά, όπως η βιταμίνη C και η βιταμίνη E, μπορούν να προστεθούν στα τρόφιμα για την πρόληψη χημικών αντιδράσεων στις οποίες το οξυγόνο συνδυάζεται με άλλες ουσίες. Τέτοιες αντιδράσεις είναι επιβλαβείς για τα ανθρώπινα κύτταρα. Η βιταμίνη E, η βιταμίνη C και το σελήνιο εμπλέκονται στο σχηματισμό της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης που είναι ζωτικής σημασίας για τους μηχανισμούς αποτοξίνωσης στα κύτταρα. Με τη χρήση γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης μειώνει τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων σε αλκοόλες και το ελεύθερο H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο νερό. Η γλουταθειόνη είναι ένα πολύ απλό μόριο που παράγεται φυσικά στο ανθρώπινο σώμα. Το μόριο μπορεί να προσκολληθεί στις ελεύθερες ρίζες και στα βαρέα μέταλλα μέσω της ομάδας θείου του (Soha S et al., 2006)

#### **2.4.5.10.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΙΩΣΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ**

Οι τεχνικές για την εξάλειψη της αφλατοξίνης μπορεί να είναι είτε φυσικές είτε χημικές μέθοδοι. Η απομάκρυνση των πυρήνων, των σπόρων και των ξηρών καρπών που έχουν υποστεί ζημιά από μούχλα από τα προϊόντα έχει παρατηρηθεί ότι μειώνει τις αφλατοξίνες κατά 40-80% (Park, 2002). Η τύχη της αφλατοξίνης ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο θερμικής επεξεργασίας (π.χ. μαγείρεμα, ξήρανση, παστερίωση, αποστείρωση και ξήρανση με ψεκασμό) (Galvano et al., 1996). Η τύχη της αφλατοξίνης ποικίλλει

ανάλογα με τον τύπο θερμικής επεξεργασίας (π.χ. μαγείρεμα, ξήρανση, παστερίωση, αποστείρωση και ξήρανση με ψεκασμό) (Galvano et al., 1996). Οι αφλατοξίνες αποσυντίθενται σε θερμοκρασίες 237-306°C (Rustom, 1997). Επομένως, η παστερίωση του γάλακτος δεν μπορεί να προστατεύσει από τη μόλυνση από AFM1. Οι Awasthi et al. (2012) ανέφεραν ότι ούτε η παστερίωση ούτε ο βρασμός επηρέασαν το επίπεδο AFM1 στο βόειο γάλα. Ωστόσο, ο βρασμός κόκκου καλαμποκιού μείωσε τις αφλατοξίνες κατά 28% και το τηγάνισμα μετά το βρασμό μείωσε τα επίπεδα τους κατά 34-53% (Stoloff and Trucksess, 1981). Το ψήσιμο καρυδιών φιστικιού στους 90°C, 120 °C και 150 °C για 30, 60 και 120 λεπτά βρέθηκε να μειώνει τα επίπεδα της αφλατοξίνης κατά 17-63% (Yazdanpanah et al., 2005). Η μείωση της περιεκτικότητας σε αφλατοξίνη εξαρτάται από το συνδυασμό χρόνου και θερμοκρασίας. Επιπλέον, το αλκαλικό μαγείρεμα και το σπάσιμο του καλαμποκιού για την παραγωγή τортίγιων μειώνει την αφλατοξίνη κατά 52% (Torres et al., 2001). Ο Hameed (1993) ανέφερε μειώσεις της περιεκτικότητας σε αφλατοξίνη 50-80% μετά από την διαδικασία εξώθησης και μόνο. Όταν προστέθηκε υδροξείδιο (0,7 και 1,0%) ή όξινο ανθρακικό (0,4%), η αναγωγή αυξήθηκε σε 95%. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν από τον Cheftel (1989) για το εξωθητικό μαγείρεμα αλευριού φιστικιών. Η υψηλότερη μείωση της αφλατοξίνης βρέθηκε να είναι 59% με περιεκτικότητα σε υγρασία 35% στο αλεύρι φιστικιών και οι μεταβλητές εξώθησης δεν επηρέασαν σημαντικά τη θρεπτική της σύνθεση (Saalia and Philips, 2011a). Οι Saalia και Philips (2011b) ανέφεραν μείωση κατά 84% στην αφλατοξίνη του γεύματος με φιστίκι όταν μαγειρεύονταν παρουσία χλωριούχου ασβεστίου.

Διάφορες θεραπείες, συμπεριλαμβανομένων χημικών, φυσικών και βιολογικών μεθόδων χρησιμοποιούνται συνήθως για αποτελεσματική αποδόμηση, μετριασμό και διαχείριση της αφλατοξίνης (Shcherbakova et al., 2015). Οι αφλατοξίνες AFB1 και AFG1 αφαιρούνται εντελώς με επεξεργασία όζοντος στα 8,5-40 ppm σε διαφορετικές θερμοκρασίες, αλλά οι AFB2 και AFG2 δεν επηρεάζονται από αυτήν τη μέθοδο. Η υποβάθμιση της αφλατοξίνης ακολούθησε την κινητική εξίσωση πρώτης τάξης. Ωστόσο, προτιμάται η μικροβιακή και ενζυμική αποδόμηση για τη βιοαποικοδόμηση της αφλατοξίνης λόγω της φιλικής προς το περιβάλλον φύσης της (Agriropoulou et al., 2016). Σύμφωνα με πληροφορίες, το βακτήριο *Flavobacterium aurantiacum* αφαιρεί το AFM1 από το γάλα και οι *Nocardia asteroides* μετασχηματίζουν το AFB1 σε προϊόν φθορισμού (Wu et al., 2009). Τα είδη *Rhodococcus* είναι σε θέση να αποικοδομήσουν τις αφλατοξίνες (Teniola et al., 2005) και η ικανότητά τους να αποικοδομούν το AFB1 εμφανίζεται με την ακόλουθη σειρά: *R. ruber* <*R. globerulus* <*R. coprophilus* <*R. gordoniae* <*R. pyridinivorans* (Cserhati et al., 2013). Μύκητες όπως *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Trichosporon mycotoxinivorans*, *S. cerevisiae*, *Trichoderma* strains και *Armillariella tabescens* είναι γνωστό ότι μετατρέπουν το AFB1 σε λιγότερο τοξικές μορφές (Guan et al., 2008). Οι Zhao et al. (2011) ανέφεραν καθαρισμό εξωκυτταρικών ενζύμων από το βακτήριο *Mycococcus fulvus* ANSM068 με τελική ειδική δραστηριότητα  $569,44 \times 103 \text{ U / mg}$ . Το καθαρό ένζυμο (100 U / mL) είχε ικανότητα αποικοδόμησης 96,96% για AFG1 και 95,80% για AFM1 μετά από 48 ώρες επώασης. Επιπλέον, η ανασυνδυασμένη πλάκα που παράγεται από τον *A. niger* D15-Lcc2 # 3 (118 U / L) βρέθηκε να οδηγεί σε μείωση της AFB1 κατά 55% εντός 72 ωρών (Alberts et al., 2009).

Η αρχή του βιολογικού ελέγχου του ανταγωνιστικού αποκλεισμού των τοξικογόνων στελεχών του *A. flavus* περιλαμβάνει τη χρήση μη τοξικογόνων στελεχών για τη μείωση της μόλυνσης από αφλατοξίνες στον αραβόσιτο (Abbas et al., 2006). Η χρήση

παραγόντων βιοελέγχου όπως *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Ralstonia* spp., και *Burkholderia* spp. είναι αποτελεσματικά στον έλεγχο και τη διαχείριση των αφλατοξινών (Palumbo et al., 2006). Αρκετά στελέχη των *B. subtilis* και *P. solanacearum* που απομονώθηκαν από τη μη ριζόσφαιρα του εδάφους αραβοσίτου έχουν αναφερθεί ότι εξαλείφουν την αφλατοξίνη (Nesci et al., 2005). Ο βιολογικός έλεγχος της παραγωγής αφλατοξίνης σε καλλιέργειες στις ΗΠΑ έχει εγκριθεί από την Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος και χρησιμοποιούνται δύο εμπορικά προϊόντα που βασίζονται σε ατοξινογόνα στελέχη *A. flavus* (Afla-guard R και AF36 R) για την πρόληψη της αφλατοξίνης στα φιστίκια, το καλαμπόκι και βαμβάκι (Dorner, 2009). Οι καλές γεωργικές πρακτικές (GAPs) βοηθούν επίσης στον έλεγχο των τοξινών σε μεγαλύτερο βαθμό, όπως η έγκαιρη φύτευση, η παροχή επαρκούς διατροφής στα φυτά, ο έλεγχος των ζιζανίων και η εναλλαγή των καλλιεργειών, οι οποίες ελέγχουν αποτελεσματικά τη μόλυνση από *A. A. flavus* στον αγρό (Ehrlich and Cotty, 2004; Waliyar et al., 2013). Ο βιολογικός έλεγχος αναδύεται ως μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη διαχείριση της αφλατοξίνης στα αράπικα φιστίκια χρησιμοποιώντας *Trichoderma* spp και έχουν καταγραφεί σημαντικές μειώσεις της μόλυνσης της αφλατοξίνης 20-90% (Anjaiah et al., 2006; Waliyar et al., 2015). Χρησιμοποιήθηκε επίσης η χρήση αδραντοποιημένων αραβοσίτου ανθεκτικών στην αφλατοξίνη. Θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν πιθανοί βιοχημικοί δείκτες και γονίδια για αντοχή στον αραβόσιτο έναντι του *Aspergillus* (Chen et al., 2007). Επιπλέον, οι βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις έχουν αναθεωρηθεί για στρατηγικές διαχείρισης αφλατοξίνης (Yu, 2012). Οι εξελίξεις στην έρευνα με βάση τη γονιδιωματική τεχνολογία και την αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος *A. flavus* έχουν υποστηρίξει την ταυτοποίηση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή και τροποποίηση της διαδικασίας βιοσύνθεσης αφλατοξίνης (Bhatnagar et al., 2003; Cleveland, 2006; Holbrook et al., 2006; Ehrlich, 2009). Επιπλέον, ο Wu (2010) πρότεινε ότι η συσσώρευση αφλατοξίνης μπορεί να μειωθεί χρησιμοποιώντας διαγονιδιακό αραβόσιτο Bt με χαρακτηριστικά αντοχής στα έντομα, καθώς ο τραυματισμός που προκαλείται από έντομα βοηθά στη διεύδυση του *Aspergillus* σε πυρήνες καρπών.

## **2.4.6 ΑΛΛΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ**

### **2.4.6.1 ΚΙΤΡΙΝΙΝΗ**

Οι μύκητες *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niveus* και ο *Penicillium citrinum* ευθύνονται για την παραγωγή της μυκοτοξίνης κιτρινίνης(citrinin) η οποία έχει νεφροτοξική δράση (Manabe, 2001). Το 1931 απομονώθηκε από καλλιέργεια του μύκητα *penicillium* (Hetherington and Raistrick, 1931; EFSA, 2012; da Rocha et al., 2014).

Η κιτρινίνη έχει χρώμα κίτρινο και εντοπίζεται σε διάφορα τρόφιμα όπως λαχανικά, φασόλια, φρούτα, βότανα και μπαχαρικά αλλά κυρίως προσβάλλει τους αποθηκευμένους καρπούς και δημητριακά .Είναι κρυσταλλική ουσία και μπορεί να διαλύεται με πολικούς οργανικούς διαλύτες και θερμά υδατικά διαλύματα . (Xu et al., 2006)

Το 1971 καταγράφηκε για πρώτη φορά το σύνδρομο «του κίτρινου ρυζιού» στην Ιαπωνία και συνδέθηκε επιδημιολογικά με την κιτρινίνη όπως και με την χρήση του μύκητα *Munascus purpureus* σε παραδοσιακά προϊόντα ζύμωσης της Ανατολής που χρησιμοποιούνταν για τον χρωματισμό των προϊόντων, την ενίσχυση της γεύσης, την συντήρηση κρέατος, τον βρασμό κρασιού κ.α.. στην Ασία παράγουν το «κόκκινο μουχλιασμένο ρύζι» (RMR) με την χρήση του μύκητα *Munascus spp.*

Η συνύπαρξη της κιτρινίνης με την ωχροτοξίνη Α ή με την πατουλίνη στους χυμούς φρούτων (EFSA 2012; da Rocha et al., 2014) είναι νεφροτοξική για τον άνθρωπο και οι περιπτώσεις χρόνιας έκθεσης σε αυτήν έχουν συνδεθεί με την Βαλκανική Ενδημική Νεφροπάθεια (Gurta, 2007).

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει νομοθετική θέσπιση ανώτατων επιτρεπτών ορίων για την κιτρινίνη σε τρόφιμα και ζωοτροφές λόγω έλλειψης ερευνητικών μελετών. Ο FAP (Food and Agriculture Organization) δεν έχει επίσημα ορίσει τα όρια ML's της κιτρινίνης για τρόφιμα και ζωοτροφές. Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση της EFSA καθώς δεν την έχει συμπεριλάβει στον ΕΚ 1881/2006 (EFSA, 2012).

#### **2.4.6.2 ΕΡΓΟΤΙΝΗ**

Η μύκητας του γένους *Claviceps* παράγουν την μικοτοξίνη Εργοτίνη. Ο μύκητας *Claviceps purpurea* προκαλεί την ερυσιβώδεις όλυρα ή εργοτίαση των σιτηρών. Πρόκειται για μία ασθένεια που προσβάλλει τα δημητριακά και κυρίως την σίκαλη. Συνήθης φαινόμενο γίνεται όταν στο περιβάλλον επικρατούν υψηλά ποσοστά υγρασίας. Σημαντική επίδραση τόσο στον ανθρώπινο οργανισμό όσο και στα ζώα έχουν αλκαλοειδή παράγωγα όπως λυσεργικό οξύ, εργοταμίνη, εργοκριστίνη, εργομετρίνη κ.α., τα οποία προέρχονται από το σκληρώτιο του συγκεκριμένου ασκομύκητα (Lapinskas, 2007). Τα αλκοειδή εργοτίνης (ergot alkaloids) δημιουργούν οίδημα των άκρων, γάγγραινα και θάνατο (King, 1979) ή προβάλλουν το κεντρικό νευρικό σύστημα και προκαλούν παράλυση και παραισθήσεις (Peraica et al., 1999).

Ο Εργοτισμός (Ergotism) αποτελεί μια από τις πλέον συχνότερες περιπτώσεις μικοτοξίκωσης. Από τα αρχαία χρόνια γίνεται αναφορά για τα χαλασμένα δημητριακά. Ο συγκεκριμένος μύκητας χρησιμοποιούνταν από τον Ιπποκράτη για τον σταματημό της αιμορραγίας μετά τον τοκετό. Η μόλυνση του ανθρώπου από τον *Claviceps purpurea* πραγματοποιείται μέσω του αλευριού σίκαλης. Το συγκεκριμένο αλεύρι το χρησιμοποιούσαν πολύ στην κεντρική και βόρεια Ευρώπη κατά την διάρκεια του Μεσαίωνα. Το 944-945 μ.χ. μια ασυνήθιστη επιδημία για την εποχή αυτή οφείλονταν για τον θάνατο 20.000 περίπου ατόμων στην Ακουιτάνια της Γαλλίας. Επίσης κατά τις χρονολογίες 1581-1587-1596 μ.χ αναφέρονται στην Γερμανία αντίστοιχα περιστατικά επιδημίας (Schiff, 2006). Το 1926-1927 κοντά στο Ουράλια όρη της Ν.Ρωσίας, στην περιοχή Σαραπολ υπάρχουν αναφορές για 11.319 ασθενείς. Το 1927, 200 εβραίοι πρόσφυγες κατανάλωσαν μολυσμένο από τον μύκητα ψωμί και ασθένησαν στο Μάντσεστερ της Αγγλίας, όπως επίσης το 1951, 230 ασθενείς σε τουριστική περιοχή της Γαλλίας, από προϊόντα τοπικού αρτοποιείου (Schiff, 2006).

Στα ζώα συνήθως τα συμπτώματα είναι γαγγραινώδη, νευρολογικές διαταραχές, αταξία, αποβολές, απώλεια αυτιών, ουράς, νυχιών και αγαλαξία (Richard, 2007; Düringer et al., 2012; Craig et al., 2015). Ο Εργοτισμός έχει σχεδόν εξαφανιστεί σαν ασθένεια στον άνθρωπο εκτός από μεμονωμένα περιστατικά. Στον άνθρωπο μόνο δύο μορφές Εργοτισμού μπορεί να παρατηρηθούν ο γαγγραινώδης και σπασμωδικός Εργοτισμός. Λόγο της αγκισταλτικής ικανότητας τα αλκαλοειδή της Εργοτοξίνης χρησιμοποιούνται στην φαρμακολογία. Το λισεργικό οξύ χρησιμοποιείται για την παρασκευή παραισθησιογόνου ναρκωτικού LSD. Η Ευρώπη έχει θεσμοθετήσει όρια ανίχνευσης για τα δημητριακά η EFSA (2012) προτείνει το όριο των 0.3 µg/kg έως 3.6 µg/kg σωματικού βάρους/ημέρα και 0.6 µg/kg σ.β/ημέρα για παιδιά και ενήλικες αντίστοιχα. Στην Αμερική δεν υπάρχει μέχρι και σήμερα καμία θεσμοθέτηση (Craig et al., 2015).



## **ΜΕΡΟΣ 2<sup>ο</sup>**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

Από τον Μάιο έως τον Ιούλιο του 2020 συλλέχθηκαν συνολικά 30 δείγματα τυριού ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ από διάφορα σημεία λιανικής πώλησης στον νομό Ιωαννίνων. Πιο συγκεκριμένα το σύνολο των δειγμάτων που συλλέχθηκαν, προέρχονταν από τα εξής σημεία προέλευσης:

- 20 δείγματα αφορούσαν το μετσοβόνο παραγωγής του ιδρύματος «Τοσίτσα». Τα δείγματα συλλέχθηκαν από σημεία λιανικής πώλησης τόσο του ιδρύματος όσο και από άλλα σημεία λιανικής στα οποία ήταν διαθέσιμα τα προϊόντα του και έγινε προσπάθεια να αφορούν όσες περισσότερες παρτίδες. Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν από την περιοχή του Μετσόβου και από την ευρύτερη περιοχή των Ιωαννίνων.
- 10 δείγματα αφορούσαν μικρούς ιδιοπαραγωγούς τύπου ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ, όπου η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στα σημεία λιανικής πώλησής τους ή απευθείας από τους παραγωγούς. Τα δείγματα αυτά επίσης συλλέχθηκαν από την περιοχή του Μετσόβου και από την ευρύτερη περιοχή των Ιωαννίνων.

Η μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε υπό συνθήκες ψύξης και διατηρούνταν στην κατάψυξη μέχρι την εξέτασή τους.

#### **3.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Μ1 ΣΤΟ ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ**

Η συγκέντρωση της αφλατοξίνης Μ1 (AFM1) στα παραπάνω δείγματα από το ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ προσδιορίστηκε με την Ανοσοενζυμική Μέθοδο «ELISA». Η εξέταση των δειγμάτων έγινε στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν με την τυποποιημένη δοκιμή « Ridascreen Aflatoxin M1» του οίκου «R-Biopharm» για τον προσδιορισμό της αφλατοξίνης, όπου και ακολουθήθηκαν τα βήματα της διαδικασίας όπως προτείνει ο κατασκευαστής. Επίσης, η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε κάτω από συνθήκες μειωμένης παρουσίας φωτός, προκειμένου να αποφευχθεί πιθανή αλλοίωση των δειγμάτων, καθώς οι αφλατοξίνες παρουσιάζουν ευαισθησία στην παρουσία φωτός.

Η επιλογή της συγκεκριμένης μεθόδου έγινε διότι επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της αφλατοξίνης, είναι απλή στη χρήση, με ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα και χαμηλό κόστος συγκριτικά με άλλες μεθόδους. Επιπλέον δεν απαιτεί ιδιαίτερη προεργασία του υπό εξέταση δείγματος και χρησιμοποιεί μικρές ποσότητές του.

Η συγκέντρωση της αφλατοξίνης M1 στα δείγματα του ΜΕΤΣΟΒΟΝΕ ταξινομήθηκε σε τρεις κατηγορίες, με σκοπό την καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Οι 3 κατηγορίες είναι οι ακόλουθες:

1. Συγκεντρώσεις μικρότερες των 10 ppt ( $< 10 \text{ ppt}$ ), ή απουσία αφλατοξίνης M1
2. Συγκεντρώσεις αφλατοξίνης M1 από 10 έως 50ppt ( $10\text{ppt} \leq \text{AFM1} < 50\text{ppt}$ )
3. Συγκεντρώσεις αφλατοξίνης M1 από 50 έως 80ppt ( $50\text{ppt} \leq \text{AFM1} < 80 \text{ ppt}$ )

Οι τιμές των 50 και 80 ppt αποτελούν το νομοθετικό όριο και το ανώτερο όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης μεθόδου ανάλυσης (ELISA) για την αφλατοξίνη M1, αντίστοιχα. Το όριο των 50 ppt επιλέχθηκε καθώς αποτελεί το ανώτερο αποδεκτό όριο συγκέντρωσης αφλατοξίνης M1, όπως ορίζεται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΚ) 1881/2006.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΣΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### 4.1 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων γίνεται στους παρακάτω πίνακες 4.1, 4.2 και 4.3 για τα δείγματα από το Ίδρυμα «ΒΑΡΩΝΟΥ ΜΙΧΑΗΛ ΤΟΣΙΤΣΑ», τους μικρούς παραγωγούς, αλλά και για το σύνολο των δειγμάτων παρακάτω πίνακα ( Πίνακας 4.1).

Στον πίνακα 4.1 που παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τα 20 δείγματα από το Ίδρυμα «ΒΑΡΩΝΟΥ ΜΙΧΑΗΛ ΤΟΣΙΤΣΑ», προκύπτει ότι σε κανένα από τα δείγματα που εξετάστηκαν με την ανοσοενζυμική μέθοδο «ELISA» δεν ανιχνεύτηκε αφλατοξίνη M1 (AFM1) σε συγκέντρωση μεγαλύτερη της τάξης των 50ng/Kg, που τίθεται από την νομοθεσία. Επίσης, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι σε κανένα από τα 20 δείγματα δεν ανιχνεύτηκε αφλατοξίνη M1 (AFM1) στην κατηγορία συγκέντρωσης 10 έως 50ppt, που σημαίνει ότι σε όλη την παραγωγική διαδικασία ο συγκεκριμένος κίνδυνος κυμαίνεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ασφαλών προϊόντων. Σε όλα τα δείγματα από το Ίδρυμα «ΒΑΡΩΝΟΥ ΜΙΧΑΗΛ ΤΟΣΙΤΣΑ» καταγράφηκε συγκέντρωση αφλατοξίνης M1 <10 ppt.

**Πίνακας 4.1: Αποτελέσματα της μελέτης για τη συγκέντρωση της AFM1 σε δείγματα τυριού από το Ίδρυμα «ΒΑΡΩΝΟΥ ΜΙΧΑΗΛ ΤΟΣΙΤΣΑ».**

Προέλευση δειγμάτων	Συγκέντρωση AFM1 <10ppt	Συγκέντρωση 10 ppt ≤ AFM1 <50ppt	Συγκέντρωση 50 ppt ≤ AFM1
ΙΔΡΥΜΑ ΒΑΡΩΝΟΥ ΜΙΧΑΗΛ ΤΟΣΙΤΣΑ	20	0	0
ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΣΤΗΚΑΝ	20	20	20
<b>ΠΟΣΟΣΤΟ %</b>	100%	0%	0%

Στον πίνακα 4.2 που παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τα 10 δείγματα από μικρούς παραγωγούς στην περιοχή Μετσόβου της Περιφερειακής ενότητας Ιωαννίνων, προκύπτει ότι σε κανένα από τα δείγματα (0%) που εξετάστηκαν με την ανοσοενζυμική μέθοδο «ELISA» δεν ανιχνεύτηκε αφλατοξίνη M1 (AFM1) σε συγκέντρωση μεγαλύτερη του νομοθετικού ορίου των 50 ng/Kg. Όμως, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι σε 3 από τα 10 δείγματα (30%), που εξετάστηκαν, ανιχνεύτηκε αφλατοξίνη M1 (AFM1) στην κατηγορία συγκέντρωσης 10 έως 50 ppt. Στα δείγματα αυτά βρέθηκαν συγκέντρωσεις 16, 18 και 19 ppt. Αυτό σημαίνει ότι το σύνολο των δειγμάτων αυτής της προέλευσης παρουσίασαν συγκέντρωση αφλατοξίνης M1 χαμηλότερη από το κρίσιμο όριο των 50 ng/Kg. Η καταγραφή όμως 3 δειγμάτων με συγκέντρωση M1 στην περιοχή

των 10 έως 50 ppt σημαίνει ότι σε όλη την παραγωγική διαδικασία ο κίνδυνος βρίσκεται υπό έλεγχο, όμως χρειάζεται η λήψη προαπαιτούμενων προγραμμάτων τόσο σε επίπεδο εκτροφής, αλλά και συνεχείς έλεγχοι σε επίπεδο Α ύλης ώστε να διασφαλίζεται διαρκώς η παραγωγή ασφαλών προϊόντων.

**Πίνακας 4.2: Αποτελέσματα της μελέτης για τη συγκέντρωση της AFM1 σε δείγματα τυριού από μικρούς παραγωγούς.**

Προέλευση δειγμάτων	Συγκέντρωση AFM1 <10 ppt	Συγκέντρωση 10 ppt ≤ AFM1 <50ppt	Συγκέντρωση 50 ppt ≤ AFM1
ΜΙΚΡΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΟΙ	7	3	0
ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΣΤΗΚΑΝ	10	10	10
<b>ΠΟΣΟΣΤΟ %</b>	<b>70%</b>	<b>30%</b>	<b>0%</b>

Αντίστοιχα, στον πίνακα 4.3 παρουσιάζονται τα συνολικά αποτελέσματα για τα 30 δείγματα από μικρούς παραγωγούς και από το Ίδρυμα «ΒΑΡΩΝΟΥ ΜΙΧΑΗΛ ΤΟΣΙΤΣΑ». Όπως αναφέρεται σε κανένα από τα δείγματα (0%) που εξετάστηκαν με την ανοσοενζυμική μέθοδο «ELISA» δεν ανιχνεύτηκε αφλατοξίνη M1 (AFM1) σε συγκέντρωση μεγαλύτερη του των 50 ng/Kg, που τίθεται από την νομοθεσία. Σε 3 από τα 30 δείγματα (10%), βρέθηκε αφλατοξίνη M1 (AFM1) στην κατηγορία συγκέντρωσης 10 έως 50 ppt. Στα δείγματα αυτά βρέθηκαν συγκέντρωσεις 16, 18 και 19 ppt. Αυτό σημαίνει ότι το σύνολο των δειγμάτων είναι ασφαλή όμως χρειάζεται λήψη μέτρων τόσο σε επίπεδο εκτροφής, όσο και σε επίπεδο Α ύλης, ώστε να διασφαλίζεται διαρκώς η παραγωγή ασφαλών προϊόντων.

**Πίνακας 4.3: Συνολικά αποτελέσματα της μελέτης για τη συγκέντρωση της AFM1 σε δείγματα τυριού από μικρούς παραγωγούς και από το Ίδρυμα «ΒΑΡΩΝΟΥ ΜΙΧΑΗΛ ΤΟΣΙΤΣΑ».**

Προέλευση δειγμάτων	Συγκέντρωση AFM1 <10ppr	Συγκέντρωση 10 ppr ≤ AFM1 <50ppr	Συγκέντρωση 50 ppr ≤ AFM1
ΙΔΡΥΜΑ ΒΑΡΩΝΟΥ ΜΙΧΑΗΛ ΤΟΣΙΤΣΑ	20	0	0
ΜΙΚΡΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΟΙ	7	3	0
ΣΥΝΟΛΟ/ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΣΤΗΚΑΝ	27/30	3/30	0/30
<b>ΠΟΣΟΣΤΟ %</b>	<b>90%</b>	<b>10%</b>	<b>0%</b>

## 4.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη αφορά την εξέταση 30 δειγμάτων μετσοβόνη, ενός ελληνικού τυριού ΠΟΠ που παράγεται στην περιοχή του Μετσόβου της Περιφερειακής ενότητας Ιωαννίνων στην Ήπειρο, για την παρουσία αι τον ποσοτικό προσδιορισμό της αφλατοξίνης M1 (AFM1). Τα δείγματα εξετάστηκαν με την Ανοσοενζυμική Μέθοδο «ELISA» και συγκεκριμένα με την τυποποιημένη δοκιμή « Ridascreen Aflatoxin M1» του οίκου «R-Biopharm». Τα δείγματα συλλέχθηκαν από σημεία λιανικής πώλησης και από μικρούς παραγωγούς. Σε κανένα από τα 30 δείγματα που εξετάστηκαν (0%) δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία της AFM1 σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 50 ppr που προβλέπεται στην νομοθεσία.

Σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη οι Malissiova et al. (2016) εξέτασαν 25 δείγματα φέτας από την ελληνική αγορά για την παρουσία AFM1, επίσης με μέθοδο ELISA. Σε κανένα από τα 25 δείγματα του ελληνικού ΠΟΠ τυριού δεν ανιχνεύθηκε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 50 ppr. Μάλιστα οι συγγραφείς αναφέρουν ότι οι συγκεντρώσεις που καταγράφησαν ήταν πολύ χαμηλές (0.54 to 4.09 ng/l) που δηλώνει την ασφάλεια των ελληνικών ΠΟΠ τυριών ως προς τον κίνδυνο των αφλατοξινών.

Ομοίως σε μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε από τους Cano-Sancho et al. (2010) στην Καταλονία της Ισπανίας αναλύθηκαν με την μέθοδο της ELISA 216 δείγματα συνολικά, από τα οποία 72 ήταν γάλακτος, 72 δείγματα γιαουρτιού και 72 δείγματα τυριού. Στη μελέτη αυτή οι συγγραφείς επίσης αναφέρουν ότι και τα 72 δείγματα τυριού ήταν αρνητικά στην παρουσία της AFM1.

Σε άλλες μελέτες, οι F. Temamogullari και A. Kanici (2010) σε τυχαία δείγματα (50) λευκού τυριού από καταστήματα της αγοράς της «Sanhurfa» της Τουρκίας, ύστερα από ανάλυσή τους με την μέθοδο της ELISA βρήκαν σε όλα τα δείγματα AFM1, ωστόσο σε

κανένα δεν ήταν πάνω από τα επιτρεπτά όρια. Οι Sarica et al. σε μελέτη τους το 2015 στην Άγκυρα ανέλυσαν συνολικά 70 δείγματα εκ των οποίων τα 27 ήταν λευκό τυρί. Τα αποτελέσματα ήταν ότι στο 92,6% των δειγμάτων λευκού τυριού ήταν θετικά στην παρουσία AFM1, ωστόσο μόνο σε 2 τυριά η συγκέντρωση ήταν μεγαλύτερη από τα ανώτερα επιτρεπτά όρια της ΕΕ και εντός των ορίων της τουρκικής νομοθεσίας (250 ng/Kg).

Αντιθέτως, υψηλές συγκεντρώσεις πάνω από τα επιτρεπόμενα όρια βρέθηκε σχεδόν στο 60 % των θετικών δειγμάτων σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο TLC στην Τεχεράνη στο Ιράν σε λευκό τυρί από τον Kamkar (2006). Παρόμοια μελέτη σε ιρανικό λευκό τυρί από τους Tavakoli et al (2011) ύστερα από την ανάλυση δειγμάτων με την μέθοδο ELISA παρατήρησαν ακριβώς το ίδιο ποσοστό, δηλαδή 60% των δειγμάτων ήταν πάνω από τα ανώτατα επιτρεπτά όρια. Επιπρόσθετα σε μελέτη παρουσίας αφλατοξίνης M1 σε τυριά επιλεγμένα δείγματα γάλακτος και τυριού της Βόρειας Αφρικής από τους Elgerbi et al. (2007) όπου συλλέχθηκαν 20 δείγματα φρέσκου λευκού μαλακού τυριού απευθείας από 20 τοπικά γαλακτοκομικά εργοστάσια στα βορειοδυτικά της Λιβύης και αναλύθηκαν HPLC για την παρουσία της αφλατοξίνης M1. Δεκαπέντε από τα 20 δείγματα λευκού μαλακού τυριού (75,0%) έδειξαν την παρουσία AFM1 σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0,11 και 0,52 ng/g τυριών.

Στον πίνακα 4.4 έχει γίνει μια ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας για μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε τυριά για την παρουσία και τη συγκέντρωση της AFM1 από το 2008 και μεταγενέστερα.

Τόσο στην ελληνική όσο και στην ξένη βιβλιογραφία, αναφέρεται ότι η συγκέντρωση της AFM1 μπορεί να εμφανίζει μια περιοδικότητα αναλόγως την εποχή και της κλιματολογικές συνθήκες. Για παράδειγμα οι Janaína, S. B. Et al. (2019) παρατήρησαν σε κανένα από τα 25 δείγματα τυριού δεν βρέθηκε AFM1, το οποίο το απέδωσαν στην διατροφή των βοοειδών στην ύπαιθρο όλο τον χρόνο και χωρίς την προσθήκη ζωοτροφών, ωστόσο παρατήρησαν επίσης διακύμανση της συγκέντρωσης αφλατοξίνης στο γάλα κατά την διάρκεια της περιόδου ξηρασίας, της μεταβατικής και της περιόδου των βροχών σε διάφορες περιοχές του Αμαζονίου. Επίσης και οι Amir Rahimirad et al. στη μελέτη τους έδειξαν ότι το επίπεδο AFM1 στα γαλακτοκομικά προϊόντα επηρεάζεται από την εποχή και τον τύπο προϊόντος.

**Πίνακας 4.4: Παρουσίαση αποτελεσμάτων ερευνών από διάφορες χώρες σε διάφορα είδη τυριών για την ανίχνευση AFM1 (MPL & MRL < 50 ppt είναι το ανώτερο επιτρεπτό όριο συγκέντρωσης αφλατοξίνης για την Ευρωπαϊκή Ένωση , EC: No 1881/2006 )**

ΧΩΡΑ	ΕΙΔΟΣ ΤΥΡΙΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (+) ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ AFM1/ ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΜΕΘΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	ΠΗΓΕΣ
ΙΤΑΛΙΑ	ΜΑΚΡΑΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ( 3-12 μηνών)	15/88 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 86.9 ppt (MRL <50 ppt)	ELISA	Maria Teresa Montagna et al, 2008
	ΜΕΡΙΚΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ (1-3 μηνών)	17/88 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 131.85 ppt (MRI <50 ppt)	ELISA	
	ΜΙΚΡΗΣ ΩΡΙΜΑΣΗΣ (< 1 μήνα)	12/89 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 81.6 ppt (MRL <50 ppt)	ELISA	
ΑΙΓΥΠΤΟΣ	«KARISH»	46/118 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 871 ppt ( MRL <50 ppt)	TLC-UV/ HPLC	Ahmed A. Ismaiel et al., 2020
	ΜΑΛΑΚΑ ΤΥΡΙΑ	20/50 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 70.63 ppt (MPL <50 ppt)	ELISA	A. Amr Amer and M. A. Ekbal Ibrahim, 2010
	ΣΚΛΗΡΑ ΤΥΡΙΑ	19/50 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 132.24 ppt (MPL <50 ppt)	ELISA	
	ΕΠΙΞΕΡΓΑΣΜΕΝΑ ΤΥΡΙΑ	11/50 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 52.52 ppt (MPL <50 ppt)	ELISA	
ΤΟΥΡΚΙΑ	«ERZURUM mouldy cheese»	0/20	ELISA	Ezgi Özgören and A. Kemal Seçkin, 2016
	«KONYA mouldy cheese»	5/20 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 41,4 ppt (MPL <50 ppt)	ELISA	
	«ISPARTA mouldy comlek cheese	17/20 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 132 ppt (MPL <50 ppt)	ELISA	
	«MERSIN mouldy tulum cheese»	20/20 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 405 ppt (MPL <50 ppt)	ELISA	
	«KAYSERI mouldy cheese»	10/20 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 38.5 ppt (MPL <50ppt)	ELISA	
	«ÜRFA CHEESE» ( ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟ ΛΕΥΚΟ ΤΥΡΙ ΑΛΜΗΣ)	36/127 όπου τα 13/36 είχαν συγκέντρωση AFM1 >250 ppt.	ELISA	Kursat Kav et al., 2011
	«KASHAR»	132/132, όπου τα 109/132 δείγματα είχαν συγκέντρωση AFM1 >50 ppt κατά μ.ο. 194 ppt	ELISA	K. Kaan Tekinsen and H. Semih Eken, 2008
	ΛΕΥΚΑ ΤΥΡΙΑ	10/25 και μ.ο 17,14 ppt, συγκέντρωση μικρότερη του ανώτερου επιτρεπτού ορίου της Ευρώπης, των 50 ppt	HPLC-FD	Suzan Öztürk Yılmaz and Alev Altinci, 2018
	«KASHAR»	17/26 και μ.ο 25,5 ppt, συγκέντρωση μικρότερη του ανώτερου επιτρεπτού ορίου της Ευρώπης, των 50 ppt	HPLC-FD	
ΚΟΥΒΕΪΤ	ΛΕΥΚΑ ΤΥΡΙΑ ΠΟΙΚΙΛΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ	32/40 με διακύμανση στη συγκέντρωση της AFM1 23.8-452 ppt από τα οποία τα 12 ήταν > 50 ppt	ELISA	Dashti B. et al., 2009
ΙΣΠΑΝΙΑ	ΦΡΕΣΚΑ ΤΥΡΙΑ	5/9 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 42.6 ppt (MPL <50 ppt)	HPLC	BARRIOS M. J., 1996
	ΜΕΡΙΚΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ	5/9 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 73.8 ppt (MPL <50 ppt)	HPLC	

	ΜΑΚΡΑΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ	6/17 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 105.33 ppt (MPL <50 ppt)	HPLC	
ΒΡΑΖΙΛΙΑ	«MINAS FRESCAL CHEESE»	6/24 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 142 ppt (MPL <50)	HPLC	C. A. F. Oliveira et al., 2011
	«MINAS PADRÃO CHEESE»	7/24 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 118 ppt (MPL <50 ppt)	HPLC	
ΕΛΛΑΔΑ	ΦΕΤΑ	25/25, ωστόσο και στα 25 δείγματα η συγκέντρωση της AFM1 κυμαίνονταν από 0,54 με 4,09 ppt, δηλαδή κατά πολύ κάτω του ανώτερου επιτρεπτού ορίου τα 50 ppt	ELISA	Eleni Malissiova et al., 2016
ΚΟΣΤΑ-ΡΙΚΑ	ΜΑΛΑΚΑ ΦΡΕΣΚΑ ΤΥΡΙΑ	44/70 είχαν μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 85 ppt	HPLC	G. Chavarría et al., 2015
ΙΡΑΝ	ΛΕΥΚΑ ΤΥΡΙΑ	93/116 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 198.6 ppt εκ των οποίων τα 33 υπερέβαιναν και το ανώτερο όριο του Ιράν, τα 250 ppt	ELISA	Aziz A. Fallah et al., 2009
	ΤΥΡΙΑ ΚΡΕΜΑΣ	68/94 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 166,4 ppt, εκ των οποίων τα 18 υπερέβαιναν και το ανώτερο όριο του Ιράν τα 250 ppt	ELISA	
	ΛΕΥΚΑ ΤΥΡΙΑ	29/45 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 135 ppt	ELISA	Fateme Akrami Mohajeri et al., 2013
	LIGHVAN	10/37 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 90.8 ppt	ELISA	
	ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΕΙΔΗ ΤΥΡΙΩΝ	Το 92% περίπου των δειγμάτων ξεπερνούσε το ανώτερο επιτρεπτό ευρωπαϊκό όριο για τις αφλατοξίνες	ELISA	Mohammad Rezaei et al., 2015
	ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΑ ΤΥΡΙΑ	25/40 ( 65%) και μ.ο συγκέντρωσης AFM1 158 ng/Kg (ppt)	ELISA/ HPLC-FD	Rozhin Bahrami et al., 2016
	ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΕΙΔΗ ΤΥΡΙΩΝ	52/100 και μ.ο. 133 ppt, με μόνο τα 8/52 να ξεπερνούν το ανώτατο για το Ιράν όριο των 250 ppt, ενώ στα 48/100 αρνητικά δείγματα δεν ανιχνεύτηκε καθόλου AFM1	ELISA	Ali Sharifzadeh et al., 2017
	«LIGHVAN»	27/62 και μ.ο συγκέντρωσης AFM1 98.1 ppt, όπου τα 7/27 δείγματα να υπερβαίνουν το ανώτερο όριο για το Ιράν, των 250 ppt	ELISA/ HPLC-FD	Yasser Shahbazi et al., 2017
	«ΚΟΟΖΕΗ»	24/62 και μ.ο συγκέντρωσης AFM1 97.7 ppt, όπου τα 15/24 δείγματα να υπερβαίνουν το ανώτερο όριο για το Ιράν, των 250 ppt	ELISA/ HPLC-FD	
	«ΣΙΑΗΜΑΖΓΙ»	35/58 και μ.ο συγκέντρωσης AFM1 132.9 ppt, όπου τα 11/35 δείγματα να υπερβαίνουν το ανώτερο όριο για το Ιράν, των 250 ppt	ELISA/ HPLC-FD	
	«ΚΗΚΙ»	44/58 και μ.ο συγκέντρωσης AFM1 175.3 ppt, όπου τα 15/ 44 να υπερβαίνουν το ανώτερο όριο για το Ιράν, των 250 ppt.	ELISA/ HPLC-FD	
	«TALESH»	42/58 και μ.ο συγκέντρωσης AFM1 174.5 ppt, όπου τα 14/42 να υπερβαίνουν το ανώτερο όριο για το Ιράν, των 250 ppt	ELISA/ HPLC-FD	
«LACTIC»	22/62 και μ.ο συγκέντρωσης AFM1 70.7 ppt, όπου τα 3/22 δείγματα να υπερβαίνουν το ανώτερο όριο για το Ιράν, των 250 ppt	ELISA/ HPLC-FD		
ΚΙΝΑ	ΤΥΡΙΑ ΑΠΟ ΓΑΛΛ ΝΕΡΟ-ΒΟΥΒΑΛΟΥ	17/17 και μ.ο. συγκέντρωσης AFM1 43.1 ppt (MPL <50 ppt) με 4/17 δείγματα να κυμαίνονται από 51 με 500 ppt	ELISA/ HPLC	Ling Guo et al., 2019



ΚΥΠΡΟΣ	ΧΑΛΟΥΜΙ	από βιομηχανοποιημένο χαλούμι τα 8/36 και τα 2/36 είχαν συγκέντρωση AFM1 που κυμαίνονταν από 1.00 με 3.90 και από 4.00 με 6.90 ppt αντίστοιχα, ενώ σε δείγματα από χαλούμι ιδιοπαρασκευής τα 20/92 βρέθηκαν με συγκέντρωση AFM1 από 1.00 μέχρι 18.90 ppt	ELISA	Barış ÖZTÜRK et al., 2014
ΑΙΘΙΟΠΙΑ	ΤΥΠΙ «COTTAGE»	Και τα 82 δείγματα ήταν πάνω από το ανώτερο αποδεκτό όριο (<0,05 µg/L)	ELISA	Selamawit Tadesse et al., 2020
ΜΕΞΙΚΟ	ΤΥΠΙ «OAXACA»	9/30 όπου το 30% αυτών των δειγμάτων ήταν πάνω από το ανώτερο όριο των 250 ppt. Ωστόσο, τα 21/30 δείγματα ήταν κάτω από το ελάχιστο όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.	HPLC-FD	Estela Hernández Camarillo et al., 2018

### 4.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία συλλέχθηκαν 30 δειγμάτα τυριού μετσοβόνα, ενός ελληνικού τυριού ΠΟΠ που παράγεται στην περιοχή του Μετσόβου στην Ήπειρο. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την παρουσία και την συγκέντρωση της αφλατοξίνης M1 (AFM1) με την Ανοσοενζυμική Μέθοδο «ELISA» και συγκεκριμένα με την τυποποιημένη δοκιμή «Ridascreen Aflatoxin M1» του οίκου «R-Biopharm». Τα δείγματα συλλέχθηκαν από σημεία λιανικής πώλησης και από μικρούς παραγωγούς. Σε κανένα από τα 30 δείγματα που εξετάστηκαν (0%) δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία της AFM1 σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 50 ppb που προβλέπεται στην νομοθεσία. Μόλις σε 3 δείγματα (10%) ανιχνεύθηκε παρουσία της AFM1 σε συγκεντρώσεις πολύ χαμηλότερες από το νομοθετικό όριο σε δείγματα που προέρχονταν από μικρούς παραγωγούς τύπου μετσοβόνα. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη της αποτελεσματικότητας της εφαρμογής των κατάλληλων διαδικασιών για την παραγωγή του ελληνικού ΠΟΠ τυριού, ιδιαίτερα στις μεγάλες εγκαταστάσεις παραγωγής του προϊόντος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός προϊόντος υψηλής ασφάλειας για τον καταναλωτή. Σε ορισμένες εγκαταστάσεις θα μπορούσε να προταθεί η εφαρμογή συχνότερων ελέγχων των ζωοτροφών σε επίπεδο εκτροφής, αλλά και του παραγόμενου γάλακτος.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ

- Ancient Egypt: Cheese discovered in 3,200-year-old tomb. (χ.χ.). (<https://www.bbc.com/news/world-africa-45233347> Προσπελαση την 25/10/2020)
- Evidence of 7,200-year-old cheese making found on the Dalmatian Coast. (χ.χ.). (<https://phys.org/news/2018-09-earliest-mediterranean-cheese-production-revealed.html> Προσπελαση την 25/10/2020)
- History of Cheese - National Historic Cheesemaking Center. (χ.χ.). (<https://nationalhistoriccheesemakingcenter.org/history-of-cheese/> Προσπελαση την 25/10/2020)
- Ingemark, D. (2011). Columella's De re rustica Put in Perspective. (<https://lup.lub.lu.se/search/publication/d8d0d001-6bce-4c8e-b139-e1dae0cd9614> Προσπελαση την 25/10/2020)
- The History Of Cheese: From An Ancient Nomad's Horseback To Today's Luxury Cheese Cart. (χ.χ.). (Lifestyle Direct, Inc.: <http://www.thenibble.com/REVIEWS/main/cheese/cheese2/history.asp> Προσπελαση την 25/10/2020 )
- <http://www.mycotoxins.info/en/mycotoxins/mycotoxins-definition/> Προσπελαση την 25/10/2020
- <https://www.knowmycotoxins.com/mycotoxins/types-of-mycotoxins/> Προσπελαση την 25/10/2020
- <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins> Προσπελαση την 25/10/2020
- <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/6113> Προσπελαση την 25/10/2020
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2020.6113> Προσπελαση την 25/10/2020
- <https://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/pub/5172> Προσπελαση την 25/10/2020
- **World Health Organization.** "Basic food safety for health workers". Geneva: World Health Organization; 1999 [cited 2017 Jul 25] ([https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/65992/WHO\\_SDE\\_PHE\\_FOS\\_99\\_1.jsessionid=54593852337C3085FF7CEDBC38B0B464?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/65992/WHO_SDE_PHE_FOS_99_1.jsessionid=54593852337C3085FF7CEDBC38B0B464?sequence=1) Προσπελαση την 25/10/2020),
- **Benford D, Boyle C, Dekant W, Fuchs R, Gaylor DW, Hard G, McGregory DB, Pitt JI, Plestina R, Shephard G, et al.** "Ochratoxin A. Safety evaluation of certain mycotoxins in food". WHO Food Additives Series 47. FAO Food and Nutrition Paper. Geneva: World Health Organization IPCS; 2001 [cited 2017 Jul 25]. (<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm> Προσπελαση την 25/10/2020.)
- **Walker R.** Mycotoxins of growing interest. Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins, Tunis, 1999. ([http://www.fao.org/es/ESN/food/pdf/mycotoxins\\_report\\_en.pdf](http://www.fao.org/es/ESN/food/pdf/mycotoxins_report_en.pdf) Προσπελαση την 25/10/2020 )
- **FAO.** Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. 2004. ([http://www.fao.org/documents/showcdr.asp?url\\_file=/docrep/007/y5499e/y5499e0f.htm](http://www.fao.org/documents/showcdr.asp?url_file=/docrep/007/y5499e/y5499e0f.htm) Προσπελαση την 25/10/2020)

- **Dutch National Institute of Public Health and the Environment**, 2003, cited from FAO. Reducing ochratoxin A in coffee. 2005. ([http://www.Coffee-ota.org/proj\\_background.asp](http://www.Coffee-ota.org/proj_background.asp) Προσπελαση την 25/10/2020)

## ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

- **A. A. Ismaiel, N. A. Tharwat, M. A. Sayed, & S. A. Gameh.** “Two-year survey on the seasonal incidence of aflatoxin M1 in traditional dairy products in Egypt”. **Journal of Food Science and Technology**, vol. 57, p.2182–2189, (2020).
- **A. Amr Amer and M. A. Ekbal Ibrahim.** “Determination of aflatoxin M1 in raw milk and traditional cheeses retailed in Egyptian markets”. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences** Vol. 2, Issue 4, p. 50-53, (2010)
- **A. Espinosa-Calderon, L. Miguel, R. Francisco, J. Roberto, R.G. Guevara Gonzalez, I. Torres-Pacheco,** (2011). “Methods for Detection and Quantification of Aflatoxins. *Aflatoxins - Detection, Measurement and Control*”.
- **A. Kamkar,** (2006). “A study on the occurrence of aflatoxin M1 in Iranian Feta cheese”. *Food Control*, vol. 17, issue 10, p: 768–775
- **A. Pfohl-Leskowicz, K. Hadjeba-Medjdoub, N. Ballet, J. Schrickx, J. Fink-Gremmels,** “Assessment and characterization of yeast-based products intended to mitigate ochratoxin exposure using in vitro and in vivo models”. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2015, vol.32, p:604-616.
- **A. Vidal, V. Sanchis, A.J. Ramos, S. Marín,** “Thermal stability and kinetics of degradation of deoxynivalenol, deoxynivalenol conjugates and Ochratoxin A during baking of wheat bakery products”. *Food Chemistry*, 2015, vol.178, p:276-286.
- **A. Zinedine, J.M. Soriano, J.C. Moltó, J. Mañes,** “Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin”. *Food Chemistry and Toxicology*, 2007, vol.45, p:1-18.
- **A.C. Chaytor, J.A. Hansen, E. van Heugten, M.T. See, S.W. Kim,** “Occurrence and decontamination of mycotoxins in swine feed”. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, vol. 24, p:723–738, (2011)
- **A.E. Pohland, P.L. Schuller, P.S. Steyn,** “Physicochemical data for some selected mycotoxins”. *Pure and Applied Chemistry*, 1982, vol.54, p:2219-2284
- **A.E. Pohland, S. Nesheim, L. Friedman,** “Ochratoxin A: A review”. *Pure Appl. Chem.*, 1992, vol.64, p:1029–1046.
- **A.J. Chen, X. Jiao, Y. Hu, X. Lu, W. Gao,** “Mycobiota and Mycotoxins in traditional medicinal seeds from China”. *Toxins*, vol. 7, p. 3858–3875, (2015).
- **A.J. Veldman, A.C. Meijs, G.J. Borggreve, J.J. Heeres van der Tol,** “Carry-over of aflatoxin from cows’ food to milk”. *Animal Production Science.*, 1992, vol.55, p:163-168
- **A.T. Mata, J.P. Ferreira, B.R. Oliveira, M.C. Batoréu, M.T. Barreto Crespo, V.J. Pereira, M.R. Bronze.** “Bottled water: Analysis of mycotoxins by LC-MS/MS”. *Food Chemistry*, 2015, vol. 176, p:455–464.

- **Abdul-Baki AA, Anderson JD.** “Vigor determination in soybean seed by multiple criteria I”. *Crop Sci*, vol. 13, p.630-3, (1973).
- **Abdulrazzaq YM, Osman N, Ibrahim A.** “Fetal exposure to aflatoxins in the United Arab Emirates”. *Ann Trop Paediatr*, vol. 22, p. 3–9, (2002).
- **Afsah – Hejri L., S. Jinap, P.Hajeb, S. Radu, Sh. Shakibazadeh.** “Review on Mycotoxins in Food and Feed: Malaysia Case Study”. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 12, p.629-651(2013)
- **Agriopoulou S., Koliadima A., Karaiskakis G., Kapolos J.** “Kinetic study of aflatoxins’ degradation in the presence of ozone”. *Food Control*, Vol. 61, p. 221–226, (2015)
- **Agrios G.** «*Plant pathology*». 5th ed. Boston (MA): Elsevier Academic Press; 2005.
- **Akande K. E., Abubakar M. M., Adegbola T. A., Bogoro S. E.** “Nutritional and health implications of mycotoxin in animal feed”. *Pak. J. Nutr.*, vol. 5, p. 398–403, (2006).
- **Ali Sharifzadeh, Payam Ghasemi-Dehkordi, Mohsen Foroughi, Elham Mardanpour-Shahrekordi, Shahin Ramazi.** “Aflatoxin M1 Contamination Levels in Cheeses Sold in Isfahan Province, Iran”. *Osong Public Health and Research Perspectives*, vol.8, issue: 4, p. 260-263, (2017)
- **Amir Rahimirad, Hassan Maalekinejad, Araz Ostadi, Samal Yeganeh, Samira Fahimi,** “Aflatoxin M1 Concentration in Various Dairy Products: Evidence for Biologically Reduced Amount of AFM1 in Yoghurt”. *Iran J Public Health*, vol. 43, issue 8, p.1139–1144, (2014).
- **Awad W.A. Ghareeb, K., Bohm, J., Razzazi E., Hellweg P., Zentek J.,** “The impact of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) on poultry”. *Int.J. Poult. Sci.*, vol. 7, p. 827-842, (2008)
- **Awasthi V., Bahman S., Thakur L. K., Singh S. K., Dua A., and Ganguly S.** “Contaminants in milk and impact of heating: an assessment study”. *Indian J. Public Health*, vol. 56, p. 95–99, (2012).
- **Aydin A., Gunsen U., Demirel S.** “Total aflatoxin B1 and ochratoxin A levels in Turkish wheat flour”. *J. Food Drug Anal.*, vol. 16, p. 48–53, (2008)
- **Aziz A. Fallah , Tina Jafari, Ali Fallah, Mohammad Rahnam.** “Determination of aflatoxin M1 levels in Iranian white and cream cheese”. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 47, p.1872–1875, (2009).
- **Azizi I.Gholampour, S.Shateri, M. Mousavizadeh M.** “Isolation and identification of the mycotoxigenic and non- mycotoxigenic fungi from foodstuff and feedstuff in Mazandaran Province, Northern Iran”. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 6, issue 18, p:3993- 3999, (2012)
- **Azziz-Baumgartner E, Lindblade K, Giesecker K, Rogers HS, Kieszak S, Njapau H, Schleicher R, McCoy LF, Misore A, DeCock K, et al.** “Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004”. *Environ Health Perspect*, vol. 113, p. 1779-83, (2005).
- **B. Dashti, Al-Hamli S., H. Alomirah, S. Al-Zenki, A. B. Abbas, W. Sawaya.,** “Levels of aflatoxin M1 in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed”. *Food Control*, vol. 20, issue: 7, p.686–690, (2009).
- **B. Markovic, S. Lebedev, M. Djordjevic, M Arambasic.** “Endemic urinary tract cancer in Bulgaria, Yugoslavia and Romania: Etiology and pathogenesis”. *Med. Biol. Environ.* 1976, p:1–2.

- **B.A.Rotter, D.B. Prelusky, J.J.Pestka.** “*Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin)*”. *Journal of Toxicology Environmental Health*, 1996, vol. 48, p:1-34,
- **Barış Öztürk, Fatma Çelik, Yusuf Çelik Seray Kabaran, Tevhide Ziver.** “*To Determine the Occurrence of Aflatoxin M1 (AFM1) in Samples of Cyprus Traditional Cheese (Halloumi): A Cross-Sectional Study*”. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, volume 20, issue 5, p.773-778, (2014).
- **Bbosa S. Godfrey , David Kitya, A. Lubega, Jasper Ogwal-Okeng , William W. Anokbonggo and David B. Kyegombe** (2013) “*Review of the Biological and Health Effects of Aflatoxins on Body Organs and Body Systems*”Chapter 12
- **Bennett J. W.** 1987. “*Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathology*”. *Mycopathologia*, vol. 100, p:3-5, (1987).
- **Berry C** (1988) “*The pathology of mycology*”. *J Pathol*, vol.154, p:301-311.
- **Bhat R., Rai RV., Karim A.A.,** (2010) “*Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns*”. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, vol.9, p: 57-81.
- **Bhat RV, Krishnamachari KA, Nagarajan V, Tilak TB.** “*Hepatitis due to aflatoxicosis: an outbreak in western India*”. *Lancet*, 1975, vol. 305, p:1061-3.
- **Bimezoka D., Doll S., Raua H., Goyarts T., Wundrackd N., Naumann M., Danicke S., Rothkotter H-J.,** “*The Fusarium toxin deoxynivalenol disrupts phenotype and function of monocyte-derived dendritic cells in vivo and in vitro*” *Immunobiology*, vol.212, p:655-666, (2007).
- **Brase S., Encinas A., Keck J., Nising C.F.** (2009) “*Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites*”. *Chemistry Review*, vol.109, p:3903-3990, (2009)
- **Bruce B. Jarvis,** “*Chemistry and Toxicology of Molds Isolated from Water-Damaged Buildings*”. *Mycotoxins and Food Safety*, vol.504, p:43-52, (2002).
- **Bryden L. Wayne** “*Mycotoxins in the food chain: human health implications*”. *Asia pac J Clin Nutr*, vol. 16 (Suppl 1), p: 95-101, (2007)
- **Bui-Klimke T., F. Wu,** “*Evaluating weight of evidence in the mystery of balkan endemic nephropathy*”. *Risk Anal.*, 2014, vol.34, p:1688–1705
- **C. A. F. Oliveira, R. C. Franco, R. E. Rosim, A. M. Fernandes.,** “*Survey of aflatoxin M1 in cheese from the North-east region of São Paulo, Brazil*”. *Food Additives and Contaminants: Part B*, vol.4, issue 1, p:57–60, (2011)
- **C. L.Morgan, D. J. Newman, C. P. Price,** “*Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine*”. *Clinical Chemistry*, vol.42, no. 2, p:193–209, (1996).
- **C. Probst, H. Njapau, P. J. Cotty,** (2007). “*Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent*”. *Applied Environmental Microbiology*, vol.73, p:2762–2764
- **Campbell, A. D., Whitaker, T. B., Pohland, A. E., Dickens, J. W., and Park, D. L.** (1986). “*Sampling, sample preparation, and sampling plans for foodstuffs for mycotoxin analysis*”. *Pure Appl. Chem.*, vol. 58, p:305–314.
- **Cano-Sancho German, SoniaMarin, Antonio J.Ramos, JuanPeris-Vicenteand and Vicente Sanchis,** (2010) “*Occurrence of aflatoxin M1 and exposure assessment in Catalonia (Spain)*”, *Revista Iberoamericana de Micologia*, vol.27, issue 3, p:130–135
- **CAST,** «*Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems*». CAST (2003); Report No. 139

- **Cathey C.G., Nuang Z.G., Sarr A.B., Clement B.A., T.D. Phillips**, “Development and evaluation of a minicolumn assay for the detection of aflatoxin M1 in milk”. **J Dairy Sci**, vol. 77, p:1223-1231, (1994).
- **Cavaliere, C., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R., and Lagana, A.** (2006). “Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk:: Comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources”. **Journal of Chromatography A**, vol. 1101, p:69–78.
- **Cheftel J. C.** (1989). “Extrusion cooking and food safety,” in *Extrusion Cooking*, eds Mercier C., Linko P., Harper J. M. (Eagan, MN: American Association of Cereal Chemists; ), 435–461.
- **Codex Alimentarius Commission** (2001) “Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M1 in milk”. Codex Committee on food additives and contaminants. 33rd session, Hague, Netherlands.
- **Commission Regulation (EC) (2006b)** “No 1881/2006: of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs”. Official Journal of European Union, L 364, pp. 5-24
- **Cook, W.O., Richard, J.L., Osweiler, G.D., Trampel, D.W.**. “Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B1 and M1”. *Am. J. Vet. Res.*, vol. 47, p. 1817–1825, (1986).
- **Coulter J, Lamplugh S, Suliman G, Omer M, Hendrickse R.** “Aflatoxins in human breast milk”. *Ann Trop Paediatr*, vol. 4, issue: 2, p.61–6, (1984).
- **Creppy E. Edmond.** “Update of survey, regulation and toxic effects of Mycotoxins in Europe”. *Toxicology Letters*, vol. 127, p. 19-28, (2002)
- **Creppy EE, Baudrimont I, Belmadani A, Betbeder AM.** “Aspartame as a preventive agent of chronic toxic effects of ochratoxin A in experimental animals”. *J Toxicol Toxin Rev*, vol. 15, p. 207–221, (1996).
- **Cserhati M., Kriszt B., Krifaton C., Szoboszlay S., Hahn J., Toth S., et al.** “Mycotoxin-degradation profile of *Rhodococcus* strains”. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 166, p:176–185, (2013).
- **D. Babu.** “Rapid and Sensitive Detection of Aflatoxin in Animal Feeds and Food Grains Using Immunomagnetic Bead Based Recovery and Real-Time Immuno Quantitative PCR (RT-iqPCR) Assay”. Oklahoma State University, (2010).
- **D. Ringot, A. Chango, Y.J. Schneider, Y. Larondelle,** “Toxicokinetics and toxicodynamics of Ochratoxin A, an update”. **Chemico-Biological Interactions**, 2006, vol.159, p:18-46
- **D. S. Skelley, L. P. Brown, and P.K. Besch.** “Radioimmunoassay”. **Clinical Chemistry**, vol. 19, no. 2, p. 146–186, (1973).
- **D.M. Miller, D.M. Wilson,** 1994. **Veterinary diseases related to aflatoxin.** In: **D.L. Eaton, J.D. Groopman (Eds.),** “*The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*”. Academic Press, San Diego, pp. 347–364.
- **D’Mello, J.P.F., MacDonald, A.M.C.** “Mycotoxins”. *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 69, p. 155–166 (1997).
- **da Rocha, Maria Edite, Francisco da Chagas Oliveira Freire, Fabio Erlan Feitosa Maia, Maria Izabel Florindo Guedes, Davide Rondina,** «*Mycotoxins and*

- their effects on human and animal health*». **Food Control**, vol. 36, p.159-165, (2014).
- **Dejardins AE (2006)**, “*Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics, Biology*”. St. Paul, MN: APS Press.
  - **Diaz D.E., Hagler W. M.Jr, Blackwelder J.T., Eve J.A., Hopkins B.A., Anderson K.L., Jones F.T., Whitlow L.W.** “*Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed*” *Mycopathologia*, vol. 157, issue: 2, p. 233-241, (2004)
  - **Dicostanzo, A., Johnston, L.W.H., Murphy, M.**, 1996. “*A review of the effects of molds and mycotoxins in ruminants*”. *Prof. Anim. Sci.* 12, 138–150.
  - **Diekman, M.A., Green, M.L.** “*Mycotoxins and reproduction in domestic livestock.*” *J. Anim. Sci.*, vol. 70, p. 1615–1627, (1992)
  - **Dutton M.F.** “*Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects*”. **Pharmacol Ther**, vol. 70, p:137-161, (1996).
  - **E. Anklam, J. Stroka, M. Petz**, “*Analytical methods for the determination of aflatoxins in various food matrices at concentrations regarding the limits set in european regulations: development, characteristics, limits*”. *Mycotoxin Research*, 2000, vol.16, issue 1, p. 23–42.
  - **E. Papp, K. H-Otta, G. Z'aray, and E. Mincsovic**, “*Liquid chromatographic determination of aflatoxins*”. **Microchemical Journal**, vol. 73, no. 1-2, pp. 39–46, (2002).
  - **E.E. Smith, L.F. Kubena, R.B. Braithwaite, R.B. Harvey, T.D. Phillips, A.H. Reine**, 1992, “*Toxicological evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid in broiler chickens*”. *Poult. Sci.*, vol.71, p:1136–1144.
  - **Eaton D, Ramsdell HS, Neal G (1993)**. “*Biotransformation of aflatoxins. In: Eaton D, Groopman JD (eds) The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*”. London: Academic Press, p:45-72.
  - **Edrington, T.S., Harvey, R.B., Kubena, L.F.**, 1995. “*Toxic effects of aflatoxin B1 and ochratoxin A, alone and in combination, on chicken embryos*”. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 54, p:331–336.
  - **El Khoury, A.; Atoui, A.** “*Ochratoxin A: General overview and actual molecular status*”. **Toxins**, 2010, vol.2, p:461–493.
  - **Eleni Malissiova, Eymorfia Maraidoni, Dimitra Kyriazi, Michael Gonidakis, Athanasios Manouras, Olga Gortzi, Constantinos Deligiannis.** “*Aflatoxin M1 levels in milk and dairy products in Greece – Relation to public health*”. *Clinical Nutrition ESPEN*, vol. 13, p:66-67, (2016).
  - **Elgerbi, A. M., Aidoo, K. E., Candlish, A. A. G., & Tester, R. F.** (2004). “*Occurrence of aflatoxin M1 in randomly selected North African milk and cheese samples*”. **Food Additives and Contaminants**, vol.21, issue 6, p:592–597.
  - **Elizalde-Gonzalez, M., Mattusch, J., and Wennrich, R.** (1998). “*Stability and determination of aflatoxins by high-performance liquid chromatography with amperometric detection*”. **Journal of Chromatography A**, vol.828, p:439–444.
  - **Eriksen G.S., Pettersson H.** (2004). “*Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed*”. **Anim.feed Sci. Technol.**, vol.114, p: 205-239
  - **Estela Hernández Camarillo, Alejandra Ramirez-Martinez, Magda Carvajal-Moreno, Manuel Vargas-Ortíz, Nathalie Wesolek, Guadalupe Del Carmen Rodriguez Jimenes, Miguel Ángel Garcia Alvarado, Alain-Claude Roudot, Marco Antonio Salgado Cervantes & Victor J. Robles-Olvera.** “*Assessment of*



- Aflatoxin M1 and M2 exposure risk through Oaxaca cheese consumption in southeastern Mexico*". International Journal of Environmental Health Research, Vol. 28, issue:2, p:202–213, (2018).
- **Ezgi Özgören and A. Kemal Seçkin.** "Aflatoxin M1 contaminations in mouldy cheese". *Mljekarstvo*, vol. 66, issue: 2, p. 154-159, (2016).
  - **F. Galvano, Galofaro V, Ritieni A, Bognanno M, De Angelis A, Galvano G, et al.** "Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Italy: Second year of observation". *Food Addit Contam*, 2001, vol.18, p:644-6
  - **F. Galvano, Pietri A, Bertuzzi T, Gagliardi L, Ciotti S, Luisi S, et al.** "Maternal dietary habits and mycotoxin occurrence in human mature milk". *Mol Nutr Food Res* 2008, vol.52, issue 4, p:496–501
  - **F. Galvano, V. Galofaro, and G. Galvano,** (1996). "Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products. A worldwide review". *J. Food Prot.* Vol. 59, p: 1079–1090.
  - **F. Malir, V. Ostry, A. Pfohl-Leszkowicz, J. Toman, I. Bazin, T. Roubal.** "Transfer of Ochratoxin A into tea and coffee beverages". *Toxins*, 2014, vol. 6, p:3438–3453.
  - **F. Ricci, G. Volpe, L. Micheli, and G. Palleschi.** "A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis". *Analytica Chimica Acta*, vol. 605, no. 2, pp. 111–129, 2007.
  - **F.H. Bitay, R. Glavitis, G. Sellyey,** 1979. "Mycotoxins". *Magyar Allatorvosak Lapja*, vol.34, p:417–422 (1979).
  - **FAO / WHO Joint Expert Committee on Food Additives and Contaminants,** 2001, cited from **Paster N, Lisker N, Chet I.** "Accumulation of ochratoxin A in sclerotia of *Aspergillus ochraceus*". *Canadian Journal of Botany* 1985, vol. 63, p: 661–662
  - **FAO,** 2004. "Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003". FAO Food and Nutrition paper No. 81. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
  - **Farnia P, Mohammadi F, Masjedi MR, Varnerot A, Zarifi AZ, Tabatabaee J, et al.** "Evaluation of tuberculosis transmission in Tehran: Using RFLP and spoligotyping methods". *Journal of Infection*, 2004, vol.49, p:94-101.
  - **Farr, D.F.; Bills, G.F.; Chamuris, G.P.; Rossman, A.Y.** "Fungi on Plants and Plant Products in the United States". APS Press: Eagan, MN, USA, 1989.
  - **Fateme Akrami Mohajeri, Seyed Razi Ghalebi, Mohsen Rezaeian, Hamid Reza Gheisari, Hossein Khorramdel Azad, Ali Zolfaghari, Aziz A.Fallah.** "Aflatoxin M1 contamination in white and Lighvan cheese marketed in Rafsanjan, Iran". *Food Control* Volume 33, Issue 2, p.525-527, (2013).
  - **Fernandez A, Verde MT, Gascon M, Ramos JJ, Gomez J,** (1994). "Aflatoxin and its metabolite residues in edible tissues from laying hens and broiler chickens fed a contaminated diet". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol.65, p:407-414
  - **Fernandez, A., Belio, R., Ramos, J.J., Sanz, M.C., Saez, T.,** 1997. "Aflatoxins and their metabolites in the tissues, faeces and urine from lambs feeding on an aflatoxin-contaminated diet". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol.74, p:161–168.
  - **Fink-Gremmels J** (1999) "Mycotoxins: their implications for human and animal health". *Vet Quart*, vol. 21, p:115–120.

- **Flieger M, Wurst M, Shelby R.** “Ergot alkaloids: sources, structures and analytical methods”. *Folia Microbiol*, 1997, vol.42, p:3- 30.
- **Flores-Flores M.E., Lizarraga E., A. López de Cerain, E.González-Penas,** “Presence of mycotoxins in animal milk: A review”. *Food Control*, 2015, vol.53, p:163–176.
- **Forgacs, J.** 1962. “Mycotoxicoses—the neglected diseases”. *Feedstuffs*, vol. 34, p:124-134
- **Franco, C., Fente, C., Vazquez, B., Cepeda, A., Mahuzier, G., and Prognon, P.** (1998). “Interaction between cyclodextrins and aflatoxins Q1, M1 and P1: Fluorescence and chromatographic studies”. *Journal of Chromatography A*, vol.815, issue 1, p:21–29.
- **Frazzoli Chiara, Paola Gherardi, Navneet Saxena, Giancarlo Belluzzi and Alberto Mantovani** (2017) “The Hotspot for (Global) One Health in Primary Food Production: Aflatoxin M1 in Dairy Products”. *Frontiers in Public Health*. Volume 4, article 294.
- **Frobish RA, Bradley BD, Wagner DD, Longbradley PE, Hairston H,** 1986. “Aflatoxin residues in milk of dairy-cows after ingestion of naturally contaminated grain”. *J Food Prot*, vol.49, issue 10, p:781-785.
- **Furtado RM, Pearson AM, Hogber MG, Miller ER,** 1979. “Aflatoxin residues in the tissues of pigs fed a contaminated diet”. *J Agric Food Chem*, vol.27, p:1351-1354.
- **G. Schatzmayr, E. Streit,** “Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: Facts and figures”. *World Mycotoxin J.*, 2013, vol.6, p:213-222
- **G.A. Bean, T. Fernando, B.B. Jarvis, B. Burton,** “The isolation and identification of trichothecene metabolites from a plant pathogenic strain of *Myrothecium roridum*”. *J. Nat. Prod.*, vol. 47, p:727–729, (1984).
- **G.H. Van der Stegen, P.J. Essens, J. van der Lijn,** “Effect of roasting conditions on reduction of Ochratoxin A in coffee”. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, vol. 49, p.4713-4715.
- **G.J.A. Speijers, H.P. van Egmond,** “Worldwide Ochratoxin A levels in food and feeds. In *Human Ochratoxicosis and its Pathologies*”. **Creppy, E.E., Castegnaro, M., Dirheimer, G., Eds.;** John Libbey Eurotext: London, UK, 1993; Vol. 231, pp. 85–100
- **GG. Schwartz,** “Hypothesis: Does ochratoxin A cause testicular cancer?”. *Cancer Causes Control*, 2002, vol.13, p:91-100
- **Govaris A.,** (2009) “Aflatoxins in foods of animal origin”. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 60(4) p: 534-543.
- **Govaris A., Roussi V., Koidis P. A., Botsoglou N. A.** (2001). “Distribution and stability 379 of aflatoxin M1 during processing, ripening and storage of Telemes cheese”. *Food Additives and Contaminants*, vol. 18, p: 437- 443.
- **Govaris A., V. Roussi, P.A. Koidis, N. A. Botsoglou** (2002). “Distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt”. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 19 (11) p: 1043-50.
- **Gratz S, Mykkänen H, Ouwehand AC, Juvonen R, Salminen S, El-Nezami H, et al.** “Intestinal mucus alters the ability of probiotic bacteria to bind aflatoxin B1 in vitro”. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, vol. 70, p: 6306-8.

- **Grenier B, Applegate TJ.** “*Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: Meta-analysis of published experiments in animals*”. **Toxins** (Basel) 2013, vol.5, p: 396-430
- **Guadalupe Chavarría, Fabio Granados-Chinchilla, Margarita Alfaro-Cascante, Andrea Molina.** “*Detection of aflatoxin M1 in milk, cheese and sour cream samples from Costa Rica using enzyme-assisted extraction and HPLC*”. **Food Additives and Contaminants: Part B**, 2015, vol. 8, issue 2, p: 128–135,.
- **Guo-Liang Zhang, Yu-Long Feng, Jun-Lin Song, Xiang-Shan Zhou,** “*Zearalenone: A Mycotoxin With Different Toxic Effect in Domestic and Laboratory Animals’ Granulosa Cells*”. **Frontiers in Genetics**, 2018
- **H. Boudra, P. Le Bars, J. Le Bars,** “*Thermostability of Ochratoxin A in wheat under two moisture conditions*”. **Appl. Environ. Microbiol.**, 1995, vol. 61, p:1156–1158.
- **H. de Iongh, R. Vles, P. de Vogel,** “*The occurrence and detection of aflatoxin in food*”, in *Proceedings of the Symposium on Mycotoxins in Foodstuffs*, G. H. Wogan, Ed., p. 235, MIT Press, Cambridge, Mass, USA, 1964.
- **H. Gulyas,** “*Determination of aflatoxins b1, b2, g1, g2 and m1 by high pressure thin layer chromatography*”. **Journal of Chromatography A**, vol. 319, pp. 105–111, 1985.
- **H. R. Tavakoli, M. Riazipour, A. Kamkar, H. R. Shaldehi, A. S. Mozaffari Nejad,** “*Occurrence of aflatoxin M1 in white cheese samples from Tehran, Iran*”. **Food Control**, 2012, vol.23, issue 1, p:293-295.
- **H.S Hussein, J.M. Brasel,** 2001. “*Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals*”. **Toxicology**, vol. 167, p: 101–134.
- **Hameed H. G. (1993).** “*Extrusion and Chemical Treatments for Destruction of Aflatoxin in Naturally-Contaminated Corn*”. Ph.D. thesis, University of Arizona, Tucson, AZ.
- **Harvey R.B., Kubena L.F., Huff W.E., Corrier D.E., Rottinghaus G.E., Phillips T.D.** (1990) “*Effects of treatment of growing swine with aflatoxin and T2 toxin*”. **Am J Vet Res**, vol. 51, p: 1688-1693
- **Heinonen JT, Fisher R, Brendel K, Eaton DL** (1996). “*Determination of aflatoxin B1 biotransformation and binding to hepatic macromolecules in human precision liver slices*”. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 136, p:17.
- **Henry SH, Bosch FX, Troxell TC, Bolger PM.** “*Reducing liver cancer: global control of aflatoxin*”. **Science**, 1999, vol. 286, p: 2453-4.
- **Henry SH, Whitaker T, Rabbani I, Bowers J, Park D, Price W, et al.** “*Aflatoxin M1*”. In: *The Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) editor. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food*. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations (2001). p. 1–102.
- **Huff W.E., Kubena L.F., Harvey R.B., Doerr J.A.** (1988) “*Mycotoxin interactions in poultry and swine*”. **Journal of Animal Science**, vol. 66, p: 2351-2355
- **Hwang KT, Lee W, Kim GY, Lee SK, Lee J, Jun W, et al.** “*The binding of aflatoxin B1 modulates the adhesion properties of Lactobacillus casei KCTC 3260 to a HT29 colon cancer cell line*”. **Food Sci Biotechnol** 2005;14:866-70
- **I. Balzer, C. Bogdani’c, and S. Pepeljnjak,** “*Rapid thin layer chromatographic method for determining aflatoxin B1, ochratoxin A, and zearalenone in corn*”. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, vol. 61, no. 3, pp. 584–585, 1978

- **I. Y. S. Rustom**, “Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods”. *Food Chem.*, vol. 59, p:57-67, (1997).
- **I.N. Chernozemsky, I.S. Stoyanov, T.K. Petkova-Bocharova, I.G. Nicolov, I.V. Draganov, I.I. Stoichev, Y. Tanchev, D. Naidenov, N.D. Kalcheva**, “Geographic correlation between the occurrence of endemic nephropathy and urinary tract tumours in vratza district, Bulgaria”. *Int. J. Cancer*, vol. 19, p. 1–11, (1977).
- **IARC** (2012) Agents classified by IARC Monographs, Vol. 1e104 International Agency for Research on Cancer.
- **IARC Monographs** (2012). “Chemical agents and related occupations. A review on human Carcinogens”, Vol. 100F
- **Iongh de H, Vles RO, Van pelt JG**, 1964. “Milk of mammals fed an aflatoxin containing diet”. *Nature*, vol. 202, p: 466-467.
- **J. Bellver Soto, M. Fernández-Franzón, M.J. Ruiz, A. Juan-García**, “Presence of Ochratoxin A (OTA) mycotoxin in alcoholic drinks from southern European countries: Wine and beer”. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 62, p:7643–7651, (2014).
- **J. D. Groopman, T.W. Kensler**, (2005). “Role of metabolism and viruses in aflatoxin-induced liver cancer”. *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 206, p: 131–137
- **J. I. Pit**. “Mycotoxins: Fumonisin”. *Food Science, Encyclopedia of Food Safety*, Vol. 2, 2014, p: 299-303
- **J. J. Langone, H. van Vunakis**. “Aflatoxin B1: specific antibodies and their use in radioimmunoassay”. *Journal of the National Cancer Institute*, 1976, vol. 56, issue 3, p: 591–595,.
- **J. Ramesh, G. Sarathchandra, V. Sureshkumar**, “Analysis of feed samples for aflatoxin b1 contamination by hptlc-a validated method”. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 2, pp. 373–377, 2013.
- **J. W. Bennett , M. Klich** “Mycotoxins”. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003, vol. 16, issue 3, p: 497–516.
- **J.J. Pestka, J.H. Forstell**, “Inhibition of human lymphocyte transformation by the macrocyclic trichothecenes roridin A and verrucaridin A”. *Toxicology Letters*, 1988, vol.41, p:215–222.
- **J.J. Ramos, A. Fernandez, T. Saez, M.C. Sanz, M.C. Marca**, 1996. “Effect of aflatoxicosis on blood mineral constituents of growing lambs”. *Small Ruminant Res.* Vol.21, p:233–238.
- **K. Kaan Tekinsen, H. Semih Eken**. “Aflatoxin M1 levels in UHT milk and kashar cheese consumed in Turkey”. *Food and Chemical Toxicology*, Volume 46, Issue 10, p.3287-3289, (2008).
- **K. M. Abdel-Gawad and A. A. Zohri**, “Fungal flora and mycotoxins of six kinds of nut seeds for human consumption in Saudi Arabia”. *Mycopathologia*, vol. 124, no. 1, pp. 55–64, 1993.
- **K. Sapsford, M. Ngundi, M. Moore, M. Lassman, L. Shriver-Lake, C. Taitt, F. Ligler**, (2006a). “Rapid detection of food-borne contaminants using an array biosensor”. *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol.113, issue 2, p:599-607.
- **K. Sargeant, A. Sheridan, J. O’Kelly, R. B. A. Carnaghan**, (1961). “Toxicity associated with certain samples of groundnuts”. *Nature*, vol.192, p:1096-1097
- **K.H. Do, T.J. An, S.K. Oh, Y. Moon**. “Nation-based occurrence and endogenous biological reduction of mycotoxins in medicinal herbs and spices». *Toxins*, vol.7, p. 4111–4130, (2015)

- **K.J. Van Der Merwe, P.S. Steyn, L. Fourie, Part II.** «*The constitution of Ochratoxins A, B, and C, metabolites of Aspergillus ochraceus wilh*». J. Chem. Soc., 1965, p:7083-7088.
- **K.S. Bilgrami, A.K. Choudhary,** 1998, “*Mycotoxins in preharvest contamination of agricultural crops*”. In: Sinha, K.K., Bhatnagar, D. (Eds.), *Mycotoxins, Agriculture, and Food Safety*. Marcel Dekker Publishers, New York
- **Kamkar A.** “*The study of aflatoxin M1 in UHT milk samples by ELISA*”. Iran J Vet Med 2008;2:7-12.
- **Kuiper – Goodman T. Scott P.M. and Watanabe H.** (1987) “*Risk assessment of the Mycotoxin zearalenone*”. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, vol. 7, issue 3, p: 253-306
- **Kumar Pradeep, Dipendra K. Mahato, Madhu Kamle, Tapan K. Mohanta and Sang G. Kang** (2017) “*Review. Aflatoxins: a Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management*”. **Journal Frontiers in Microbiology**, vol. 7, Article 2170
- **Kursat Kav, Ramazan Col, K. Kaan Tekinsen.** “*Detection of aflatoxin M1 levels by ELISA in white-brined Urfa cheese consumed in Turkey*”. Food Control, Volume 22, Issue 12, p:1883-1886, (2011).
- **Kushiro M.** “*Historical review of researches on yellow rice and mycotoxigenic fungi adherent to rice in Japan*”. JSM Mycotoxins 2015, vol. 65, p:19-23.
- **Kuti, J.O.; Ng, T.J.; Bean, G.A.** “*Possible involvement of a pathogen-produced trichothecene metabolite in Myrothecium leaf spot of muskmelon*”. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 1989, vol. 34, p: 41–54.
- **Lancaster, M. C., Jenkins, F. P., and Philp, J. M.** (1961). “*Toxicity associated with certain samples of groundnuts*”. **Nature** vol. 192, p: 1095–1096
- **Lee LS, Dunn JJ, De Lucca AJ and Giegler A** (1981) “*Role of lactone ring of aflatoxin B1 toxicity and Mutagenicity*”. **Experientia**, vol. 37, issue 1, p:16 -20.
- **Leslie JF and Summerell BA** (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. Ames, IA: Blackwell Publishing.
- **Ling Guo, Yanyan Wang, Peng Fei, Jianxin Liu, Daxi Ren.** “*A survey on the aflatoxin M1 occurrence in raw milk and dairy products from water buffalo in South China*”. **Food Control**, Volume 105, p.159-163, (2019).
- **Liu GT, Qian YZ, Zhang P, Dong ZM, Shi ZY, Zhen YZ, Miao J, Xu YM.** “*Relationships between Alternaria alternata and oesophageal cancer*”. IARC Sci Publ 1991, vol. 105, p:258-62.
- **Lutsky II, Mor N.** “*Alimentary toxic aleukia (septic angina, endemic panmyelotoxicosis, alimentary hemorrhagic aleukia): t-2 toxin-induced intoxication of cats*”. Am J Pathol, 1981, vol. 104, p: 189-91
- **M. A. Demirer, B. Dincer, S. Kaymaz, I. Alperden, S. Yalcin, I. Ozer.** “*Bazı gıda maddelerinde mycoflora ve mycotoxin arařtırmaları*”. A. Ü. Vet. Fak. Derg., vol. 36, p. 85–107, (1989).
- **M. Blanc, A. Pittet, R. Munoz-Box, R. Viani,** “*Behavior of Ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture*”. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 46, p:673–675, (1998).
- **M. J. Barrios, M. J. Gualda, J. M. Cabanas, L. M. Medina, R. Jordano.** “*Occurrence of Aflatoxin M1 in Cheeses from the South of Spain*”. Journal of Food Protection, vol. 59, issue 8, p:898–900, (1996).

- **M. Kivanc**, 1990. “*Mold growth and presence of aflatoxin in some Turkish cheeses*”. **Journal of Food Safety**. Vol. 10, p:287–294.
- **M. McMullen, R. Jones, D. Gallenberg**. “*Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact*”. *Plant Disease*, 1997, vol. 81, p:1340–1348.
- **M. Montagna, C. Napoli, O. De Giglio, R. Iatta, G. Barbuti**. “*Occurrence of Aflatoxin M1 in Dairy Products in Southern Italy*”. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 9, issue 12, p:2614–2621, (2008).
- **M. Poór, S. Kunsági-Máté, G. Matisz, Y. Li, Z. Czibulya, B. Peles-Lemli, T. K”oszegi**, “*Interaction of alkali and alkaline earth ions with Ochratoxin A*”. **Journal of Luminescence**, 2013, vol.135, p:276–280.
- **M. Poór, S. Kunsági-Máté, T. Bencsik, J. Petrik, S. Vladimir-Knežević, T. K”oszegi**, “*Flavonoid aglycones can compete with Ochratoxin A for human serum albumin: A new possible mode of action*”. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2012, vol.51, p:279-283
- **M. Poór, S. Kunsági-Máté, Z. Czibulya, Y. Li, B. Peles-Lemli, J. Petrik, S. Vladimir-Knežević, T. K”oszegi**, “*Fluorescence spectroscopic investigation of competitive interactions between Ochratoxin A and 13 drug molecules for binding to human serum albumin*”. **Journal Luminescence**, 2013, vol.28, p:726-733
- **M. Tajkarimi, F. Shojaee Alibadi, M. Salah Nejad, H. Pursoltani, AA Motallebi, H. Mahdavi**, “*Seasonal study of aflatoxin M1 contamination in milk in five regions in Iran*”. **International Journal of Food Microbiology**, 2007, vol. 116, p:346-349
- **M. Trucksess, W. Brumley, S. Nesheim**, “*Rapid quantitation and confirmation of aflatoxins in corn and peanut butter, using a disposable silica gel column, thin layer chromatography, and gas chromatography/mass spectrometry*”. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, vol. 67, no. 5, p:973–975, 1984.
- **M. Vosough, M. Bayat, A. Salemi**, «*Matrix-free analysis of aflatoxins in pistachio nuts using parallel factor modeling of liquid chromatography diode-array detection data*». *Analytica chimica acta*, 2010, vol.663, issue 1, p:11-18.
- **M.E. DiMenna, P.H. Mortimer, R.A. Prestidge, A.D. Hawkes, J.M. Sprosen**. “*Lolitrems B concentrations, counts of Acremonium lolii hyphae, and the incidence of ryegrass staggers in lambs Impact of mycotoxins on humans and animals on plots of A. lolii-infected perennial ryegrass*”. *N. Z. J. Agric. Res.*, vol. 35, p. 211–217, (1992).
- **M.O. Moss**, (2002) “*Risk assessment of aflatoxins in foodstuffs*”. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 50, issue 3, p: 137-142.
- **Mac Rae R. Robinson R.K. and Sadler M.J** (Eds) (1993) “*Encyclopaedia of Food Science*”. **Food Technology and Nutrition**, vol. 5. Academic Press
- **Magan N. A. Medina, D. Aldred** (2011) “*Possible climate- change effects on mycotoxin contamination of food crops pre – and postharvest*”. **Plant Pathology** vol.60 , issue 1, p: 150-163.
- **Magan N. Aldred D. Mylona K. Lampert R.J.W.** (2010) “*Limiting Mycotoxins in stored wheat*”. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 2010, vol. 27, issue 5, p: 644-650.
- **Maggon KK, Gupta SK**, “*Review; Biosynthesis of aflatoxins*”, *Venkitasubramanian TA Bacteriol Review*, 1977, vol. 41, issue 4, p:822-55.
- **Marin Sonia, Ramos J.A, Cano-Sancho G. Sanchis V.** (2012), “*Review\_Reduction of mycotoxins and toxigenic fungi in the Mediterranean basin maize chain*”. **Phytopathologia Mediterranea**, vol. 51, No1, p: 93-118

- **Masoero F, Gallo A, Moschini M, Piva G., Diaz D**, 2007. “Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts”. *Animal*, vol. 1, issue (9), p: 1344-1350.
- **Masri MS, Booth AN, Hsiegh DPH** (1974), “Comparative metabolic conversion of Aflatoxin B1 to Aflatoxin M1 and Aflatoxin Q1 by monkey, rat and chicken liver”. *Life Science*, vol. 15, p:203- 207.
- **Merza MA, Farnia P, Tabarsi P, Khazampour M, Masjedi MR, Velayati AA, et al.** “Anti-tuberculosis drug resistance and associated risk factors in a tertiary level TB center in Iran: A retrospective analysis”. **Journal of Infection in Developing Countries**, 2011, vol.5, p:511-9.
- **Miller JD.** “Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research”. *J Stored Prod Res* 1995, vol.31, p:1-16.
- **Miturski R, Tomaszewski, J., Semczuk A., Kotarski J, Jakowicki J.** “Tissue zearalenone concentration in normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium”. *Ginekol Pol.*, 1998, vol. 69, issue 5, p. 363-366.
- **MMWR** (2004). “Outbreak of aflatoxin poisoning - Eastern and central provinces, Kenya, January - July 2004”. *MMWR*, 53:790-793.
- **Mohamadi H, Alizadeh M.** “A study of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Urmia, Iran”. *Journal of Agriculture Science and Technology*, 2010, vol.12, p:579-83.
- **Mohamed Manna, Ki Deok Kim** (2017) “Influence of Temperature and Water Activity on Deleterious Fungi and Mycotoxin Production during Grain Storage”, *Mycobiology*, vol.45, issue 4, p:240-254
- **Mohammad Doost Chakoosari M., Kazemi Darsanaki R,** “Aflatoxin M1 contamination in ice-cream”. **Journal of Chemical Health Risks**, 2017, vol. 3, p:13-20.
- **Mohammad Rezaei, Ali Fani, A. Latif Moini, Parisa Mirzajani, Ali Akbar Malekiran, Mohammad Rafiei and Nasrin Atabak.** “Assessment of aflatoxin M1 levels in pasteurised milk, raw milk, and cheese in Arak, Iran”. *Toxin Reviews*, vol.34, issue: 2, p:61–65, (2015).
- **Montesano R, Hainaut P, Wild CP** (1997) “Hepatocellular carcinoma: From gene to public health”. *J Natl Cancer Inst*, vol.89, p:1844-51.
- **Mulunda M, Ngoma L, Nyirenda M, Motsei L, Bakunzi F.** “A Decade of Aflatoxin M1 Surveillance in Milk and Dairy Products in Developing Countries (2001-2011): A Review”. *Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries: InTech*; 2013
- **N.M. Pavlović,** “Balkan endemic nephropathy—Current status and future perspectives”. **Clinical Kidney Journal**, 2013, vol.6, p:257–265
- **Neal GE, Eaton DL, Judah DJ, Verma A** (1998). “Metabolism and toxicity of aflatoxins M1 and B1 in human-derived in Vitro systems”. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol.151, p:152-158.
- **Neal GE, Judah DJ, Stirpe F and Patterson DSP** (1981). “The formation of 2,3-dihydroxy-2,3-dihydro-aflatoxin B1 by the metabolism of aflatoxin B1 by liver microsomes isolated from certain avian and mammalian species and the possible role of this metabolite in the acute toxicity of aflatoxin B1”. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol.58, issue 3, p:431- 437.

- **Nicole J. Mitchell, Erin Bowers, Charles , Felicia Wu**, “*Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination*”, **Food Additives & Contaminants: Part A**, Vol. 33, 2016 ,Issue 3
- **Norred W.P., Voss K.A., Riley R.T., Plattner R.D.** (1996) “*Fumonisin toxicity and metabolism studies in the USDA*”. Fumonisin toxicity and metabolism. *Adv Exp Med Biol*, vol.392, p: 225-236.
- **NTP**, 1982. “*Carcinogenicity bioassay of zearalenone in F344/N rats and F6C3F1 mice*”. National Toxicology Program Technical Reports Series 235. National Toxicology Program. Research Triangle Park, NC, USA
- **O’Brien E, Dietrich DR.** “*Ochratoxin A: The continuing enigma*”. **Critical Reviews in Toxicology**, 2005, vol.35, issue 1, p: 33–60
- **Oliveira CAF, Kobashigawa E, Reis TA, Mestieri L, Albuquerque R, Correa B** (2000) “*Aflatoxin B1 residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin*”. *Food Addit Contam*, vol. 17, p:459-462.
- **Oliveira CAF, Rosmaninho JF, Castro AL, Butkeraitis P, Reis TA, Correa B** (2003) “*Aflatoxin residues in eggs of laying Japanese quail after long-term administration of rations containing low levels of aflatoxin B1*”. **Food Addit Contam**, vol.20 , p:648-653.
- **Orti DL, Grainger J, Ashley DL Hill RH** (1989) “*Chromatographic and spectroscopic properties of hemiacetals and sterigmatocystin metabolites*”. *J Chromatogr*, vol.462, p:269-279.
- **Ostry V., Malir F., Ruprich J.**, “*Producers and important dietary sources of Ochratoxin A and citrinin*”. **Toxins** 2013, vol. 5, p:1574–1586.
- **Oswald IP, Marin DE, Bouhet S, Pinton P, Taranu I, Accensi F** (2005) “*Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals*”. **Food Additives and Contaminants**, vol. 22, p:354–360.
- **Osweiler G.D.** (1996) “*Occurrence and clinical manifestations of tricothecene toxicoses and zearalenone toxicoses*”. In: Richards JL, Thurston JR (Eds.) *Diagnosis of Mycotoxicoses*, 1st Edition. Martins Nijhoff, Dordrecht, p.31-50
- **Ozkalp, B.** 1992. “*The Research of Mycotoxins and Mould Microflora of Mouldy Cheese Produced in Konya and Its Provinces*”. Doctorate thesis, Selcuk University, Konya
- **P. B. Luppa, L. J. Sokoll, and D. W. Chan.** “*Immunosensor— principles and applications to clinical chemistry*”. *Clinica Chimica Acta*, vol. 314, no. 1-2, pp. 1–26, 2001
- **P. Bayman, J.L. Baker**, “*Ochratoxins: A global perspective*”. **Mycopathologia**, vol. 162, p:215–223, (2006).
- **P. CiconováA. , Laciková, D. Máté**, “*Prevention of Ochratoxin A contamination of food and Ochratoxin A detoxification by microorganisms—A review*”. *Czech J. Food Sci.*, vol. 28, p.465–474, (2010)
- **P. Jeswal, D. Kumar**, “*Mycobiota and natural incidence of Aflatoxins, Ochratoxin A, and Citrinin in Indian spices confirmed by LC-MS/MS*”. **International Journal of Microbiology**. 2015, vol 242, p: 486
- **P. Rauch, L. Fukal, J. Prošek, P. Březina, and J. K’a’s.** “*Radioimmunoassay of aflatoxin M1*”. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, vol. 117, no. 3, pp. 163–169, 1987.



- **P.R. Cheeke**, “*Mycotoxins in cereal grains and supplements*”. In: Cheeke, P.R. (Ed.), *Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants*. Interstate Publishers, Inc., Danville, IL, pp. 87–136, (1998a)
- **P.R. Cheeke**, 1998b. “*Mycotoxins associated with forages*”. In: Cheeke, P.R. (Ed.), *Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants*. Interstate Publishers, Inc., Danville, IL, pp. 243–274.
- **Pang, V.F., Pan, C.Y.**, 1994. “*The cytotoxic effects of aflatoxin B1 on swine lymphocytes in vitro*”. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.*, vol. 20, p:289-301.
- **Park, D. L.** (2002). «*Effect of processing on aflatoxin*». *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol.504, p:173-179
- **Parry, D.W.; Jenkinson, P.; McLeod, L.** «*Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals-a review*». *Plant Pathology*, 1995, vol.44, p:207-238.
- **Patterson, D.S.P., Shreeve, B.J., Roberts, B.A., Berrett, S., Brush, P.J., Glancy, E.M.**, 1981. “*Effect on calves of barley naturally contaminated with ochratoxin A and groundnut meal contaminated with low concentration of aflatoxin B1*”. **Research in Veterinary Science**, vol. 31, p:213-218.
- **Pavlikova L., Jezkova A., Wu Q., Yuan Z., Dohnal V., Kuca K.**, “*Biological degradation of aflatoxins*”. **Drug Metabolism Reviews**, 2009, vol. 41, p.1-7.
- **PC Turner, B. Flannery, C. Isitt, M. Ali, J. Pestka**, 2012. “*The role of biomarkers in evaluating human health concerns from fungal contaminants in food*”. **Nutrition Research Reviews**, 2012, vol.25, p:162-179.
- **Peraica M, Radić B, Lucić A, Pavlović M.** “*Toxic effects of mycotoxins in humans*”. *Bull World Health Organ* 1999, vol.77, p:754-66.
- **Pestka J.J.** (2007) “*Deoxynivalenol toxicity, mechanisms and health risks*” In: Morgavi D.P. Riley. R.T. (Eds). *Fusarium toxins: Presence in Feeds and Toxic Effects in Animals*.p: 211-241.
- **Petterson DSP (1973).** “*Metabolism as a factor in determining the toxic action of the afl. in different animal species*”. **Food Cosmet Toxicol**, vol.11, p:287.
- **Pfohl-Leszkowicz, A.** “*Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours*”. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 2009, vol.60, p:465–483.
- **Pitt JI, Hocking AD** (2009) *Fungi and Food Spoilage*, 3rd edn. New York: Springer.
- **Pitt JI.** “*Toxigenic fungi: Which are important?*”. *Med Mycol*, 2000, vol.38S, p:17-22.
- **Pontes Netto D, Sassahara M, Yanaka EK** (2005). “*Aflatoxin occurrence in foodstuffs supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Parana state*”. *Food Chem Toxicol*, vol.43, p:981-984.
- **Pose G, Patriarca A, Kyanko V, Pardo A, Pinto VF.** “*Effect of water activity and temperature on growth of Alternaria alternata on a synthetic tomato medium*”. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, vol.135, p:60-3.
- **Price RL, Paulson JH, Lough OG, Gingg C, Kurtz AG**, (1985). “*Aflatoxin conversion by dairy-cattle consuming naturally contaminated whole cottonseed*”. **Journal of Food Protection**, vol.48, issue 1, p:11-13.
- **R. A. Zilinskas.** “*Iraq's biological weapons. The past as future?*”. **Journal of the American Medical Association**, 1997, vol. 276, p:418-424,
- **R. Glavitis, A. Vanyi,** . “*More important mycotoxicosis in pigs*”. *Magy Allatorvosok Lapja*, 1995, vol. 50, p: 407–420.

- **R. J. Cole, R. H. Cox.** 1981. “*Handbook of toxic fungal metabolites*”. Academic Press, New York, N.Y.
- **R. M. Lequin.** “*Enzyme immunoassay (eia)/enzyme-linked immunosorbent assay (elisa)*” *Clinical Chemistry*, vol.51, p:2415–2418, 2005.
- **R. Russell, M. Paterson, Nelson Lima,** “*How will climate change affect mycotoxins in food?*”, *Food Research International*, vol.43, (2010), p:1902–1914
- **R. Schoental,** “*Precocious sexual development in Puerto Rico and oestrogenic Mycotoxins (zearalenone)*” *Lancet I*,1983, p: 537
- **R. Stone,** 2001, “*Down to the wire on bioweapons talks*”. **Science**, vol.293, p:414-416
- **R.A. Cole, B.B. Jarvis, M.A. Schweikert,** “*Handbook of Secondary Metabolites*”. Academic Press: New York, NY, USA, 2003; p. 199–560
- **R.B. Harvey, T.S. Edrington, L.F. Kubena, M.H. Elissalde, G.E. Rottinghaus,** 1995. “*Effect of aflatoxin and diacetoxyscirpenol in ewe lambs*”. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, vol 54, p: 325–330.
- **Rahimi E., Bonyadian M., Rafei M., Kazemeini H.R.** (2010) “*Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran*”. *Food Chemistry and Toxicology*, vol.48, p: 129-131.
- **Rahimi Ebrahim,** (2012) “*Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Iran*”. *Toxicology and Industrial Health*, vol 30, Issue 8, p: 750-754,
- **Rheeder JP, Marasas WFO, Thiel PG, Shephard GS, and van Schalkwyk DJ** (1992) “*Fusarium moniliforme and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei*”. **Phytopathology**, vol.82, p:353-357
- **Richard J.L.** (2007) “*Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-an overview*”. *Int J Food Microbiol*, vol.119, p:3-10.
- **Richard J.L., Bennett, G. A., Ross, P. F., and Nelson, P. E.** (1993). “*Analysis of naturally occurring mycotoxins in feedstuffs and food*”. *J. Anim. Sci.*, vol.71, p:2563-2574
- **Richard J.L., Meerdink G., Maragos C.M., Tumbleson M., Bordson G., Rice L.G., Ross P.F.** (1996), “*Absence of detectable fumonisins in the milk of cows fed fusarium proliferatum (Matsushima) Nirenberg culture material*”. *Mycopathologia*, vol.133, p:123-126.
- **Rojas FJ, Jodral M, Gosalvez F, Pozo R,** 1991. “*Mycoflora and toxigenic Aspergillus flavus in Spanish dry - cured ham*”. *Int J Food Microbiol*, vol.13, p:249-256.
- **Rozhin Bahrami, Yasser Shahbazi, Zahra Nikousefat.** “*Aflatoxin M1 in milk and traditional dairy products from west part of Iran: Occurrence and seasonal variation with an emphasis on risk assessment of human exposure*”. *Food Control*, vol. 62, p:250-256, (2016).
- **S. A. Berson, R. S. Yalow.** “*General principles of radioimmunoassay*”. *Clinica Chimica Acta*, vol. 22, no. 1, p: 51-69, 1968.
- **S. Amézqueta, E. González-Peñas, M. Murillo-Arbizu, A. López de Cerain,** “*Ochratoxin A decontamination: A review*”. **Food Control**, Volume 20, p. 326–333, (2009).
- **S. B. Janaína, M. K. Ariane, S. L. Emerson, H. C. F. Pedro, S. V. Cibele, R. X. Lawrence, K. K. Augusto,** (2019). “*Aflatoxin M1 in cheese samples from the Amazon Region*”. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol.13, issue 13

- **S. Nawaz, R. D. Coker, S. J. Haswell.** “Development and evaluation of analytical methodology for the determination of aflatoxins in palm kernels”. *Analyst*, vol. 117, no. 1, pp. 67–74, 1992.
- **S. Tsuboi, T. Nakagawa, M. Tomita et al.** “Detection of aflatoxin B1 in serum samples of male Japanese subjects by radioimmunoassay and high-performance liquid chromatography”. *Cancer Research*, 1984, vol. 44, no. 3, pp. 1231-1234.
- **S.C. Duarte, A. Pena, C.M Lino.** “Ochratoxin A non-conventional exposure sources—A review”. *Microchemical Journal*, vol. 93, p:115–120, (2009).
- **S.W. Baertschi, K.D. Raney, M.P. Stone, T.M. Harris,** “Preparation of the 8,9-Epoxy of the Mycotoxin Aflatoxin B1: The Ultimate Carcinogenic Species”. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 110, p. 7929–7931, (1988).
- **Saalia F. K., Phillips R. D.** (2011b). “Reduction of aflatoxins in peanut meal by extrusion cooking in the presence of nucleophiles”. *LWT Food Sci. Technol.*, vol. 44 p.1511-1516, (2011).
- **Saalia F. K., Phillips R. D.** “Degradation of aflatoxins by extrusion cooking: effects on nutritional quality of extrudates”. *LWT Food Sci. Technol.* Vol.44, p. 1496-1501, (2011a)
- **Sachnis V., Magan N.** (2004) “Environmental profiles for growth and mycotoxin production”. In: MaganN, OlsenM, eds. *Mycotoxins in Food: Detection and Control*, Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd, p: 174-89.
- **Saenz de Rodriguez C.A, A.M.Bongiovanni, L.Conde de Borrego** (1985) «An epidemic of precocious development in Puerto Rican children». *J Pediatr.*107 p: 393-396.
- **Salminen S, Nybom S, Meriluoto J, Collado MC, Vesterlund S, El-Nezami H, et al.** “Interaction of probiotics and pathogens – Benefits to human health?”. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 21, p:157-67, (2010).
- **Sapsford, K., Taitt, C., Fertig, S., Moore, M., Lassman, M., Maragos, C., and Shriver-Lake, L.** (2006b). “Indirect competitive immunoassay for detection of aflatoxin B1 in corn and nut products using the array biosensor”. *Biosensors and Bioelectronics*, vol.21, issue 12, p:2298-2305.
- **Sarica Deniz Yurtsever, Okan Has , Serpil Taşdelen, Üstün Ezer,** (2015) “Occurrence of Aflatoxin M1 in Milk, White Cheese and Yoghurt From Ankara, Turkey Markets”. *Biological and Chemical Research*, Volume 2015, p: 36-49
- **SCF** (1994) “Standard Committee of Foods opinion on aflatoxins, ochratoxin A, and Patulin”. 94th Meeting of the SCF, European Commission, pp 1-6.
- **Selamawit Tadesse, Tarekegn Berhanu, Ashagrie Zewdu Woldegiorgis,** “Aflatoxin M1 in milk and milk products marketed by local and industrial producers in Bishoftu town of Ethiopia”. *Food Control*, 2020, vol. 118, p:1073-86.
- **Shcherbakova L., Statsyuk N., Mikityuk O., Nazarova T., Dzhavakhiya V.** (2015). «Aflatoxin B1 degradation by metabolites of *Phoma glomerata* PG41 isolated from natural substrate colonized by aflatoxigenic *Aspergillus flavus*». *Jundishapur J. Microbiol.*
- **SM. Shane,** “Economic issues associated with aflatoxins”. In: Eaton, DL and Groopman JD. (eds) *The toxicology of aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance.* Academic Press. New York, 1994, p:513-527.
- **Soha S, Mazloumi M, Borji M.** “Reduction of aflatoxin M1 residue in milk utilizing chemisorption compounds and its effect on quality of milk”. *J Arab Neonatol Forum* 2006, vol.3, p:122-7.

- **Stoloff L., Trucksess M. W.** (1981). “Effect of boiling, frying, and baking on recovery of aflatoxin from naturally contaminated corn grits or cornmeal”. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64 678–680.
- **Susan P. McCormick , April M. Stanley , Nicholas A. Stover , Nancy J. Alexander,** “*Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins*”. *Toxins*, 2011, vol. 3, p:802-814.
- **Szuetz P., Mesterhazy A., Falkay G. Y, Bartok T.,** 1997, “Early telearche symptoms in children and their relations to zearalenone contamination in foodstuffs Cereals”. *Res. Commun*, vol.25, p:429-436
- **T. Asao, G. Buchi, M. Abdel-Kader, S. Chang, E. Wick and G. N. Wogan.** «*Aflatoxins B and G*». *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 85, p. 1706–1707, (1963).
- **T. C. Tseng, C. Chow, G. Waller,** “*Immunoassay in mycotoxin research in Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxins and Insect Phenomones and Allomones*”, p. 363, 1989. R. Twyman, *Immunoassays, applications*, 2005
- **T. Degenkolb, R. Dieckmann, K.F. Nielsen, T. Gräfenhan, C. Theis, D. Zafari, P. Chaverri, A. Ismaiel, H. Brückner, , H. von Döhren et al.** “*The Trichoderma brevicompactum clade: A separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins*”. *Mycol. Prog.*, vol. 7, p. 177–219, (2008).
- **Tabuc C, Marin D, Guerre P, Sesan T, Bailly JD.** “*Molds and mycotoxin content of cereals in southeastern*”. *Romania J Food Prot*, 2009, vol. 72, p. 662–665
- **Teniola O. D., Addo P. A., Brost I. M., Farber P., Jany K. D., Alberts J. F., et al.,** “*Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of Rhodococcus erythropolis and Mycobacterium fluoranthenivorans sp. nov. DSM44556T*”. *Int. J. Food Microbiol.*, 2005, vol.105, p:111-117.
- **Thomas W. Kensler, Bill D. Roebuck, Gerald N. Wogan, John D. Groopman,** “*Aflatoxin: A 50-Year Odyssey of Mechanistic and Translational Toxicology*”. *Toxicological Sciences*, vol. 120, issue 1, p:28-48, (2011).
- **Torres P., Guzman-Ortiz M., Ramirez-Wong B.** “*Revising the role of pH and thermal treatments in aflatoxin content reduction during the tortilla and deep frying processes*”. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, vol. 49, p:2825-2829.
- **Trivedi A.B., Doi E., Kitabatake N.,** “*Detoxification of Ochratoxin A on heating under acidic and alkaline conditions*”. *Biosci. Biotech. Biochem*, 1992, vol.56, p: 741-745.
- **Tsubouchi H, Terada H, Yamamoto K, Hisada K, Y. Sakabe,** “*Caffeine degradation and increased ochratoxin production by toxigenic strains of Aspergillus ochraceus isolated from green coffee beans*”. *Mycopathologia*, 1995, vol.90, p:181-186
- **V. Betina,** “*Thin-layer chromatography of mycotoxins*”. *Journal of Chromatography*, 1985, vol.334, no.3, p: 211-276.
- **V. Roussi, A. Govaris, A. Varagouli, N.A. Botsoglou,** (2002) “*Occurrence of aflatoxin M1 in raw and market milk commercialized in Greece*”. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 19, issue 9, p:863-868.
- **Van Egmond HP,** (1989) “*Introduction. In: van Egmond HP (ed) Mycotoxins in dairy products*”. London and New York: Elsevier Applied Science, p:1-10
- **Van Egmond HP.** “*Worldwide regulations for mycotoxins*”. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2002, vol.504, p:257-69.
- **Vardon PJ, McLaughlin C, Nardinelli C.** “*Potential economic costs of mycotoxins in the United States*”. Council of Agriculture, Science, and Technology; Ames(IA):

2003. Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems (Task force report), p. 136-142. Chapter 10
- **Veprikova Z., Zachariasova M., Dzuman Z., Zachariasova A., Fenclova M., Slavikova P., Vaclavikova M., Mastovska K., Hengst D., Hajslova J.**, “*Mycotoxins in plant-based dietary supplements: Hidden health risk for consumers*”. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2015, vol.63, p:6633–6643.
  - **Virgili R., Simoncini N., Toscani T., Leggieri M.C., Formenti S., Battiliani P.** “*Biocontrol of *Penicillium nordicum*. Growth and Ochratoxin A Production by Native Yeasts of Dry Cured Ham*”. **Toxins**, 2012, vol. 4, p: 68-82,
  - **W. F. J. Busby, G. N. Wogan**, (1984). “*Aflatoxins*”. In *Chemical Carcinogens* (C. D. Searle, Ed.), pp. 945–1136. American Chemical Society, Washington, DC
  - **W. P. Blout**, 1961. “*Turkey “X” disease*”. **Turkeys**, vol. 9, issue 52, p:55-58, 61,
  - **W.B. Shim, K.S. Ha, M.G. Kim, J.S. Kim, D.H. Chung**, “*Evaluation of the transfer rate of Ochratoxin A to decoctions of herbal medicines*”. **Food Sci. Biotechnol.**, 2014, vol.23, p:2103-2108.
  - **Wan Lam Yim Murphy, Paul C. Turner, Hani El- Nezami**, “*Individual and combined cytotoxic effects of fusarium toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B1) on swine jejunal epithelial cells*”. **Food and Chemical Toxicology**, 2013, vol.57, p:276-283,
  - **WHO (World Health Organization)** (2001) “*Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants*”. WHO Food Additive Series 47. Geneva: World Health Organization
  - **Wild C, Pionneau F, Montesano R, Mutiro C, Chetsanga C.**, “*Aflatoxin detected in human breast milk by immunoassay*”. **International Journal of Cancer**, 1987, vol. 40, issue 3, p:328-33.
  - **Wild CP, Turner PC.**, “*The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions*”. **Mutagenesis**, 2002, vol. 17, issue 6, p: 471-81.
  - **Y. M. H. Younis and K. M. Malik**, «*Tlc and hplc analysis of aflatoxin contamination in sudanese peanut and peanut products*». **Kuwait Journal of Science and Engineering**, vol. 30, no. 1, 2003.
  - **Y.N. Yin, LY. Yan, J.H. Jlang, Z.H. MA**, “*Biological control of aflatoxin contamination of crops*”. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, 2008, vol.9, p: 787-792.
  - **Zahra Nikousefat, Yasser Shahbazi, Negin Karami**, “*Occurrence, seasonal variation and risk assessment of exposure to aflatoxin M1 in Iranian traditional cheeses*”. **Food Control**, 2017, vol.79, p:356-362
  - **Zhang Xiujuan, Kamil Kuča, Vlastimil Dohnal, Lucie Dohnalová, Qinghua Wue, Chu Wua** . “*Military potential of biological toxins*”. **Journal of Applied Biomedicine**, 2014, vol.12, p: 63-77 ,

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- **Αλεξόπουλος Κ.** (1997) *Μυκοτοξικώσεις: «Η πραγματική διάσταση του προβλήματος στη σύγχρονη χοιροτροφία»*. Σύγχρονη χοιροτροφία, 4: 29-33.
- **Ανυφαντάκης, Ε.Μ.** (1986) *«Τυροκοκομία»*, Εκδ. Καραμπερόπουλος Α.Ε., Αθήνα.
- **Αποστολόπουλος Ν.** (2011) *«Μελέτη της επίδρασης των φυσικοχημικών παραμέτρων ανάπτυξης της μυκοτοξίνης Ζεαραλενόνης (ZON) σε δημητριακά»*, Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Διπλωματική Εργασία, Πάτρα.
- **Βάσσης, Δ.Β.** (2004) *«Τρόφιμα και υγεία του καταναλωτή (Τροφογενείς διαταραχές)»*, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, σελ. 131-136
- **Γεωργιά Α., Καραλή Φ., Μούτσου Γκ. και Καμινारीδης Στ.** (2009) *«Η παρουσία της αφλατοξίνης Μ1 στα τυριά»*, Εθνική Επιτροπή Γάλακτος Ελλάδας (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών), 1:26-41.
- **Γεωργιάδη Μ.**, (2009) *«Μελέτη του προβλήματος των αφλατοξινών σε κελυφωτά φυστίκια»*, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Μεταπτυχιακή Ερευνητική Εργασία, Αθήνα,
- **Θεοφυλάκτου Χριστοφορίδου Σ.** (2011) *«Αξιολόγηση εμπορικών συσκευασιών της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA ως προς την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση αφλατοξίνης Μ1 σε γάλα μέσω της συγκριτικής αξιολόγησης παραμέτρων»*, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, Μεταπτυχιακή Ερευνητική Εργασία, Λάρισα
- **Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 165/2010 της Επιτροπής της 26ης Φεβρουαρίου 2010** *«για την τροποποίηση του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 για τον καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα αναφορικά με τις αφλατοξίνες»*.
- **Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 της Επιτροπής της 19ης Δεκεμβρίου 2006** *«για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα»*. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, L 364/15.
- **Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 401/2006 της Επιτροπής της 23ης Φεβρουαρίου** *«για καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα»*.
- **Κουρουσέκος Γ.** (2008) *«Διερεύνηση των επιπτώσεων από τη χορήγηση αφλατοξίνης Β1 στη χημική σύνθεση του γάλακτος και σε αναπαραγωγικές παραμέτρους της εγχώριας ποιμενικής αίγας»*, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Κτηνιατρική Σχολή, Διδακτορική Διατριβή, Θεσσαλονίκη.
- **Κουρουσέκος Γ.Δ., Μπελιμπασάκη Σ., Σαράτσης Φ., Λυμπερόπουλος Α., Μπόσκος Κ.** (2006) *«Παρουσία της αφλατοξίνης Μ1 στο νωπό γάλα αγελάδων γαλακτοπαραγωγής στην ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλονίκης»*. 10ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 40.
- **Λιόλιου Ε.** (2009) *«Μελέτη της επίδρασης ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων στη συγκέντρωση ωχρατοξίνης Α σε εργαστηριακά θρεπτικά υποστρώματα»*, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Π.Μ.Σ. Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου, Μεταπτυχιακή μελέτη, Αθήνα.
- **Μάντης Α.** (1993) *«Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του»*. Θεσσαλονίκη.
- **Μπαλατσούλας Γιώργος.** (2006) *«Μικροβιολογία Τροφίμων»*, εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ (σελ.265-270 & 526-534)

- **Τάσης Π.** (2008) *«Διερεύνηση της επίδρασης των μυκοτοξινώσεων στην πρόκληση παθολογικών καταστάσεων στον αναπαραγωγικό πληθυσμό των χοιροτροφικών εκμεταλλεύσεων»*, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Κτηνιατρική Σχολή, Διδακτορική Διατριβή, Θεσσαλονίκη.