

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ – ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΥΔΑΤΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ – ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ
ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥΣ

του Αλεξάνδρου Αριστ. Τζίτζη
Κτηνιάτρου Α.Π.Θ.

Λάρισα, 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων:	Ανδρέας Τσακάλωφ	Επίκουρος Καθηγητής
Μέλη:	Αριστοτέλης Λυμπερόπουλος	Αναπληρωτής Καθηγητής
	Σπυρίδων Λάφης	Διδάκτωρ Χημείας

Στη σύζυγό μου, Μαρία, και στον Τέλη μας

Στους γονείς μου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αναζήτηση τροφής αποτελούσε ανέκαθεν κυρίαρχη βιολογική ανάγκη του ανθρώπου, συνυφασμένη με την ίδια του την ύπαρξη. Όσο εύκολη όμως είναι στη σύγχρονη εποχή της τεχνολογικής προόδου η πρόσβαση σε κάθε είδους τροφή, τόσο επικίνδυνα μπορούν να γίνουν τα τρόφιμα για τη δημόσια υγεία, καθώς αποτελούν οικοσύστημα ανάπτυξης πολλών μικροοργανισμών, οι οποίοι είναι αλλοιογόνοι για τα ίδια τα τρόφιμα, αλλά και παθογόνοι για τον άνθρωπο. Μεταξύ αυτών των μικροοργανισμών, οι μύκητες αποτελούν μια ιδιαίτερος σημαντική ομάδα, καθώς, όχι μόνο αλλοιώνουν το τρόφιμο, αλλά παράγουν μεταβολικά προϊόντα ιδιαίτερα επιβλαβή για τον οργανισμό των ζώων και του ανθρώπου. Τα σπόρια των μυκήτων, μέσω του αέρα ή/και του νερού, μεταφέρονται στα φυτά ή στις αποθηκευμένες τροφές, και, κάτω από κατάλληλες συνθήκες περιβάλλοντος, αρχίζει η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός τους. Εφ' όσον οι κατάλληλες συνθήκες διατηρούνται, ορισμένοι μύκητες παράγουν τοξικούς, δευτερογενείς μεταβολίτες, που καλούνται μυκοτοξίνες (Diekman and Green, 1992). Η κατανάλωση των μυκοτοξινών μέσω της τροφής, μπορεί να οδηγήσει σε ποικίλα συμπτώματα, που έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση των αναπαραγωγικών αποδόσεων των ζώων, και πιθανώς τη μεταφορά των μυκοτοξινών στην τροφική αλυσίδα. Οι παθολογικές καταστάσεις που δύνανται να προκύψουν από την κατανάλωση μυκοτοξινών ονομάζονται μυκοτοξινώσεις ή μυκοτοξικώσεις.

Ανάμεσα στις μυκοτοξίνες, δεσπόζουσα θέση κατέχουν οι αφλατοξίνες, τοξινογόνα πολυκετίδια που παράγονται από μύκητες του γένους *Aspergillus* (κυρίως από τα είδη *A. flavus* και *A. parasiticus*), κατά τη διάρκεια δευτερογενούς μεταβολισμού, και στις οποίες έχουν κατά καιρούς αποδοθεί όροι, όπως καρκινογόνα, βιολογικά όπλα, και ανοσοκατασταλτικά. Στην πραγματικότητα, ο τύπος αφλατοξίνης B₁ είναι το πιο ισχυρό, φυσικά απαντώμενο καρκινογόνο, που γνωρίζει ο άνθρωπος (Geiser και συν., 1998). Άνθρωποι και ζώα μπορούν να εκτεθούν στις αφλατοξίνες, καταναλώνοντας τρόφιμα μολυσμένα με *A. flavus*. Ο μύκητας αυτός μπορεί να αναπτύξει πολλές αποικίες στα περισσότερα προϊόντα τροφίμων κατά την αποθήκευσή τους, αλλά η παθογόνος ικανότητα του *A. flavus* τον βοηθά να μολύνει καλλιέργειες, όπως το καλαμπόκι, τα φιστίκια, το βαμβάκι, και τους διάφορους ξηρούς καρπούς, αρκετό καιρό πριν τη συγκομιδή (Brown και συν., 1999).

Η κατανάλωση μολυσμένης ζωοτροφής από τα ζώα μπορεί να οδηγήσει σε ανοσοκαταστολή, αιμορραγίες, μείωση σωματικού βάρους και καρκίνο του ήπατος (Zain, 2011· Wogan, 2000). Στους ανθρώπους, οι κίνδυνοι που συνδέονται με την

κατανάλωση τροφής μολυσμένης με αφλατοξίνες έχουν μελετηθεί επαρκώς, και ο Διεθνής Οργανισμός για την Έρευνα στον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer - IARC) έχει ορίσει την αφλατοξίνη B₁ ως καρκινογόνο παράγοντα του ανθρώπινου ήπατος (Wogan, 2000). Όπως καταδεικνύουν επιδημιολογικές μελέτες, ο κίνδυνος ανάπτυξης ηπατικού καρκίνου λόγω της αφλατοξίνης είναι περίπου 30 φορές υψηλότερος στα άτομα που είχαν προηγούμενα εκτεθεί στον ιό της ηπατίτιδας B (Henry και συν., 1999). Αυτή η κατάσταση συνήθως λαμβάνει χώρα σε αναπτυσσόμενες χώρες, όπου οι συγκεντρώσεις των αφλατοξινών στα τρόφιμα δεν έχουν οριοθετηθεί νομοθετικά, και τα εμβόλια κατά της ηπατίτιδας B δε διανέμονται καθολικά. Βιοδείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί, για να συνδέσουν την αφλατοξίνη B₁ με μια ειδική αντικατάσταση (μετάλλαξη) της γουανίνης του μορίου του DNA με τη θυμίνη, στην τρίτη θέση του κωδικόνιου 249 στο γονίδιο p53. Πρόκειται για ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που μεταλλάσσεται συχνά στους ανθρώπινους καρκίνους (Chuang και συν., 2009). Ακόμα, οι κίνδυνοι που, όπως φαίνεται από τα παραπάνω, ενέχουν οι αφλατοξίνες, έχουν προκαλέσει το ενδιαφέρον των ιρακινών ειδικών στα βιολογικά όπλα, οι οποίοι κατασκεύασαν πυρομαχικά με μεγάλη συγκέντρωση συμπτυκνωμένης αφλατοξίνης (Stone, 2002). Παρόλο που η χρήση των αφλατοξινών σε ένα πρόγραμμα βιολογικών όπλων δεν ενέχει άμεσους κινδύνους για τη δημόσια υγεία, ένα τέτοιο όπλο πιθανόν να προκαλούσε μαζικό πανικό και να αποτελούσε ένα δραστικό ψυχολογικό όπλο.

Είναι, λοιπόν, εύλογο, με βάση τα δεδομένα που παρατέθηκαν παραπάνω, οι αφλατοξίνες να αποτελούν αντικείμενο πολυάριθμων μελετών, οι οποίες μελετούν το ρόλο που διαδραματίζουν οι ουσίες αυτές στη δημόσια υγεία, αλλά και τις μεθόδους που χρησιμοποιεί ο άνθρωπος για την αντιμετώπισή τους. Η παρούσα διπλωματική διατριβή έχει ως αντικείμενο την ανασκόπηση των κυριότερων από τις μελέτες αυτές.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	12
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	13
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1.1 Οι ασπέργιλλοι	14
1.1.1 Ταξινόμηση	14
1.1.1.1 Το γένος <i>Aspergillus</i>	14
1.1.1.2 <i>Aspergillus</i> τμήμα Flavi	17
1.1.1.3 Παραγωγή μυκοτοξινών από τα είδη του τμήματος Flavi	18
1.1.2 Βιολογία του πληθυσμού	21
1.1.2.1 Διάκριση σε στελέχη S και L	21
1.1.2.2 Βλαστικές ομάδες συμβατότητας (VCGs)	22
1.1.3. Οικολογία του <i>A. flavus</i>	24
1.1.3.1 Κύκλος ζωής – Παθογόνος δράση	24
1.1.3.2 Ο ρόλος των περιβαλλοντικών συνθηκών στην παθογένεια του <i>A. flavus</i>	27
1.2 Οι αφλατοξίνες	28
1.2.1 Ιστορικά στοιχεία	28
1.2.2 Παθογόνα αίτια	30
1.2.3 Φυσικές – Χημικές ιδιότητες αφλατοξινών	32
1.2.3.1 Φυσικές ιδιότητες	33
1.2.3.2 Χημικές ιδιότητες	34
1.2.4 Βιοσύνθεση αφλατοξινών	36
1.2.4.1 Γενετική της βιοσύνθεσης αφλατοξινών	36
1.2.4.2 Μεταγραφικοί κανόνες της σύνθεσης αφλατοξίνης	39
2. ΟΙ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ ΣΤΑ ΦΥΤΑ	41
2.1 Προσαρμογές για επιβίωση στο έδαφος	45
2.2 Ο ρόλος των κλιματικών συνθηκών	50
2.2.1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες	51
2.2.1.1 Θερμοκρασία	51

2.2.1.2 Βροχόπτωση	51
2.2.1.3 Σχετική υγρασία	52
2.2.2 Αφλατοξινογόνοι μύκητες και εξάρτησή τους από τις κλιματικές συνθήκες ..	53
2.2.3 Κλιματική επίδραση και στάδιο καλλιέργειας	54
2.2.4 Επιπτώσεις στη γεωργία και μελλοντικοί προβληματισμοί	57
2.3 Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξινών	58
2.4 Πιθανοί παράγοντες βιοελέγχου για την αντιμετώπιση των αφλατοξινών στα φυτά	60
2.4.1 Βακτήρια	60
2.4.2 Ζύμες	60
2.4.3 Μη τοξινογόνα στελέχη του <i>Aspergillus</i>	60
2.5 Παράγοντες που επηρεάζουν τα μη τοξιγενή στελέχη <i>Aspergillus spp</i> στη μείωση της μόλυνσης από αφλατοξίνες	61
2.5.1 Διαμόρφωση	61
2.5.2 Ενοφθαλμισμός	61
2.5.3 Εφαρμογή εντομοκτόνων	62
2.6 Μοριακοί μηχανισμοί της απώλειας της παραγωγής αφλατοξίνης στα μη τοξινογόνα στελέχη	63
3. ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΑ	65
3.1 Ακατέργαστα αγροτικά προϊόντα	67
3.2 Σιτηρά	69
3.3 Ξηροί καρποί, προϊόντα τους, και σπόροι	74
3.4 Φρούτα και λαχανικά	78
3.5 Βότανα και μπαχαρικά	79
3.6 Ζωοτροφές	83
3.6.1 Ζωοτροφές πουλερικών	86
3.6.2 Άλλες ζωοτροφές	87
3.7 Αφλατοξίνες σε τρόφιμα παραγόμενα από μολυσμένα ζώα	87
3.7.1 Σχηματισμός και Τοξικότητα της AFM ₁	91
3.7.2 Υπολείμματα αφλατοξινών στα αυγά	91
3.8 Άλλα τρόφιμα	92

4. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ	93
4.1 Μέθοδοι απομόνωσης και καθαρισμού	93
4.2 Ενόργανες μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού αφλατοξινών	99
4.2.1 Υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (LC-MS) ..	101
4.2.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή φθορισμού (HPLC-FL)	
.....	105
4.2.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με άλλους τύπους ανίχνευσης	
.....	108
4.2.4 Αέριος χρωματογραφία (GC)	110
4.2.5 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) και άλλες μέθοδοι χρωματογραφίας	
.....	111
4.2.6 Τριχοειδείς ηλεκτροφορητικές μέθοδοι	113
4.3 Ανοσοχημικές μέθοδοι	113
4.3.1 Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική μέτρηση (ELISA)	114
4.3.2 Ανοσοδιήθηση	115
4.3.3 Ταινία βαθμονόμησης πλευρικής ροής (Lateral flow dipstick)	115
4.3.4 Ανοσολογική δοκιμασία πόλωσης φθορισμού (FP)	117
4.3.5 Βιοαισθητήρας συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων	118
4.3.6 Τριχοειδής ηλεκτροφορητικός ανοσοπροσδιορισμός (CE)	119
 5. ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ	122
5.1 Ιστορικό	122
5.2 Αφλατοξίνες στα ζώα	123
5.2.1 Χοίρος	124
5.2.2 Βοοειδή	125
5.2.3 Πτηνά	126
5.2.4 Κουνέλια	127
5.2.5 Κυνοειδή	127
5.2.6 Ψάρια	128
5.2.7 Άγρια ζωή	129
5.2.8 Καρκινογένεση σε ζώα	131
5.2.9 Ανοσοκαταστολή	132
5.2.10 Αναπαραγωγή και εκκολαπτικότητα σε όρνιθες	134
5.3 Αφλατοξίνες και δημόσια υγεία	135

5.3.1 Τοξικότητα	136
5.3.2 Βιοδείκτες της έκθεσης	138
5.3.3 Οξεία τοξικότητα	139
5.3.4 Χρόνια τοξικότητα	140
5.3.5 Αφλατοξίνες και παιδιά	140
5.3.5.1 Αναστολή αύξησης	141
5.3.5.2 Kwashiorkor	142
5.3.6 Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα	144
6. ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ	145
6.1 Διατροφική έκθεση σε αφλατοξίνες	145
6.2 Επαγγελματική έκθεση σε αφλατοξίνες	145
6.3 Η γεωγραφική κατανομή της χρόνιας έκθεσης του ανθρώπου σε αφλατοξίνες	148
6.3.1 Αφρική	152
6.3.2 Νότια Αμερική	153
6.3.3 Ευρώπη	155
6.3.4 Ελλάδα	157
7. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ	158
7.1 Προληπτικά μέτρα και αφλατοξίνες	158
7.1.1 Προληπτικά μέτρα πριν τη συγκομιδή	158
7.1.1.1 Ορθές γεωπονικές πρακτικές	158
7.1.1.2 Καλλιέργεια ανθεκτικών ποικιλιών	159
7.1.1.3 Χρήση της γενετικής μηχανικής	159
7.1.1.3.α Διαγονιδιακές καλλιέργειες για την καταπολέμηση εντόμων	160
7.1.1.3.β Ενζυματική αποδόμηση των αφλατοξινών από βακτήρια	160
7.1.1.3.γ Πρόσδεση των αφλατοξινών σε στελέχη προβιοτικών βακτηρίων	162
7.1.1.3.δ Ανταγωνιστική δράση μυκήτων	163
7.1.2 Παρεμβάσεις μετά τη συγκομιδή	164
7.1.3 Προληπτικά μέτρα στους ζωικούς οργανισμούς	165
7.1.3.1 Παράγοντες παγίδευσης Novasil	165
7.1.3.2 Χλωροφυλλίνη	166
7.1.3.3 Διθειολεθιόνες (ολτιπράζη)	167

7.1.3.4 Σουλφοραφάνη	170
7.1.3.5 Πολυφαινόλες	171
7.2 Εξυγίανση τροφίμων	172
7.2.1 Εξυγίανση σιτηρών	174
7.2.2 Εξυγίανση ξηρών καρπών	175
7.3 Ανάλυση επικινδυνότητας	177
7.3.1 Αξιολόγηση του κινδύνου	178
7.3.2 Προσδιορισμός του κινδύνου	178
7.3.3 Αξιολόγηση της έκθεσης	178
7.3.4 Τρέχουσα κατάσταση της αξιολόγησης κινδύνου των αφλατοξινών	179
7.3.5 Η αξιολόγηση του κινδύνου για την AFB ₁ βάσει της καρκινογενετικότητας	180
7.3.6 Αξιολόγηση της έκθεσης στις αφλατοξίνες	181
7.3.7 Χαρακτηρισμός κινδύνου αφλατοξινών	183
7.4 Νομοθεσία	186
7.4.1 Παγκόσμια επιτρεπτά επίπεδα αφλατοξινών	187
7.4.2 Ευρωπαϊκή νομοθεσία	189
8. ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΕΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ	193
9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	196
10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	199

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

1.1. Παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών από διάφορα είδη στο <i>Aspergillus</i> τμήμα Flavi	20
1.2. Πηγές και ιδιότητες των κυριότερων αφλατοξινών	31
1.3. Φυσικές ιδιότητες αφλατοξινών	34
3.1. Κύρια προϊόντα που μολύνονται με αφλατοξίνες	67
3.2. Σύγκριση του αριθμού των ειδοποιήσεων στο σύστημα RASFF για συγκεκριμένα προϊόντα, για τα έτη 2003-2009	68
3.3. Μερικές από τις υψηλότερες τιμές μόλυνσης με αφλατοξίνες, σε παρτίδες σιτηρών και προϊόντων τους, που έχουν απορριφθεί	70
3.4. Μερικές από τις υψηλότερες τιμές μόλυνσης με αφλατοξίνες, σε παρτίδες ξηρών καρπών, προϊόντων τους, και σπόρων, που έχουν απορριφθεί	77
3.5. Μερικές από τις υψηλότερες τιμές μόλυνσης με αφλατοξίνες, σε παρτίδες φρούτων και λαχανικών, που έχουν απορριφθεί	79
3.6. Μερικές από τις υψηλότερες τιμές μόλυνσης με αφλατοξίνες, σε παρτίδες βοτάνων και μπαχαρικών, που έχουν απορριφθεί	82
4.1. Ενόργανες μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού, αποδεκτές από την Ευρωπαϊκή Ένωση και την AOAC (Association of Analytical Chemists)	100
5.1. Συγκριτικές τιμές LD ₅₀ : οι θανατηφόρες δόσεις της αφλατοξίνης B ₁	130
5.2. Αλλαγές στην απόκριση σε διάφορους μολυσματικούς παράγοντες, προκαλούμενες από την έκθεση σε αφλατοξίνες διαφόρων ζωικών ειδών	133
6.1. Εκτιμώμενη πιθανή ημερήσια έκθεση στην αφλατοξίνη M ₁ , μέσω της κατανάλωσης γάλακτος σε διαφορετικές περιοχές	150
6.2. Κατανάλωση καλαμποκιού και φιστικιών σε επιλεγμένες χώρες	151
6.3. Παρουσία της αφλατοξίνης M ₁ στο γάλα	152
6.4. Αφλατοξίνη B ₁ σε μπαχαρικά που εισάγονται στην Ευρωπαϊκή Ένωση	156
6.5. Εκτιμώμενη κατανάλωση αφλατοξίνης M ₁ στη Γαλλία	156
7.1. Κατανάλωση μολυσμένων με αφλατοξίνες τροφίμων, έκθεση και κίνδυνος καρκίνου του ήπατος σε χώρες της Αφρικής	184
7.2. Ανώτατα επιτρεπτά επίπεδα αφλατοξίνης B ₁ στα τρόφιμα	186
7.3. Μέγιστα επιτρεπόμενα όρια συγκέντρωσης αφλατοξινών στα τρόφιμα	191

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

1.1. Κονιδιοφόρος δομή του <i>Aspergillus flavus</i>	16
1.2. Ο κύκλος ζωής του <i>A. flavus</i> σε σύστημα καλλιέργειας καλαμποκιού	26
1.3. Χημικοί τύποι αφλατοξινών B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ , M ₂	33
1.4. Καθολικά αποδεκτό μονοπάτι για τη βιοσύνθεση αφλατοξίνης και στεριγματοκυστίνης	38
4.1. Στάδια εκχύλισης στερεάς φάσης	95
4.2. Αρχή λειτουργίας στήλης Mycosep	97
4.3. Βασικές αρχές στηλών ανοσοσυγγένειας	99
4.4. Εξέλιξη στις εφαρμογές της LC-MS και συνολικά MS (LC-MS, GC-MS, MALDI-TOF κ.α.) στην ανάλυση των μυκοτοξινών	104
4.5. Α. Χρωματογράφημα των αφλατοξινών G ₂ , G ₁ , B ₂ , B ₁ , χωρίς τη χρήση UV ακτινοβολίας Β. Χρωματογράφημα των αφλατοξινών G ₂ , G ₁ , B ₂ , B ₁ , με τη χρήση UV ακτινοβολίας	109
4.6. Απεικόνιση δύο μορφών ανοσολογικών δοκιμασιών με τη χρήση, είτε ακινητοποιημένων αντισωμάτων, είτε ακινητοποιημένων αντιγόνων	113
4.7. Βασική αρχή ταινίας βαθμονόμησης πλευρικής ροής	117
4.8. Ανοσολογική δοκιμασία πόλωσης φθορισμού	119
4.9. Σχηματική απεικόνιση τριχοειδούς ηλεκτροφορητικού ανοσοπροσδιορισμού ...	121
5.1. Παιδιά στην Γκάνα που πάσχουν από το σύνδρομο Kwashiorkor	143
5.2. Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε αφλατοξίνες ...	144
6.1. Περιοχές και πληθυσμοί με κίνδυνο χρόνιας έκθεσης σε αφλατοξίνη	149
6.2. Ευρωπαϊκή διανομή της καλλιέργειας καλαμποκιού	155
7.1. Πιθανός μηχανισμός αποδόμησης της αφλατοξίνης B ₁	162
7.2. Δομή ολτιπράζης	167
7.3. Μοριακός μηχανισμός αλληλεπίδρασης της ολτιπράζης με το μεταγραφικό παράγοντα NRF2	169

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

1.1. Μοριακή φυλογένεια των ειδών <i>Aspergillus</i> και τα σχετιζόμενα τελεόμορφα τους	15
5.1. Οδοί και συνέπειες της αφλατοξίνης κατά το μεταβολισμό του ανθρώπου και των ζώων	137

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

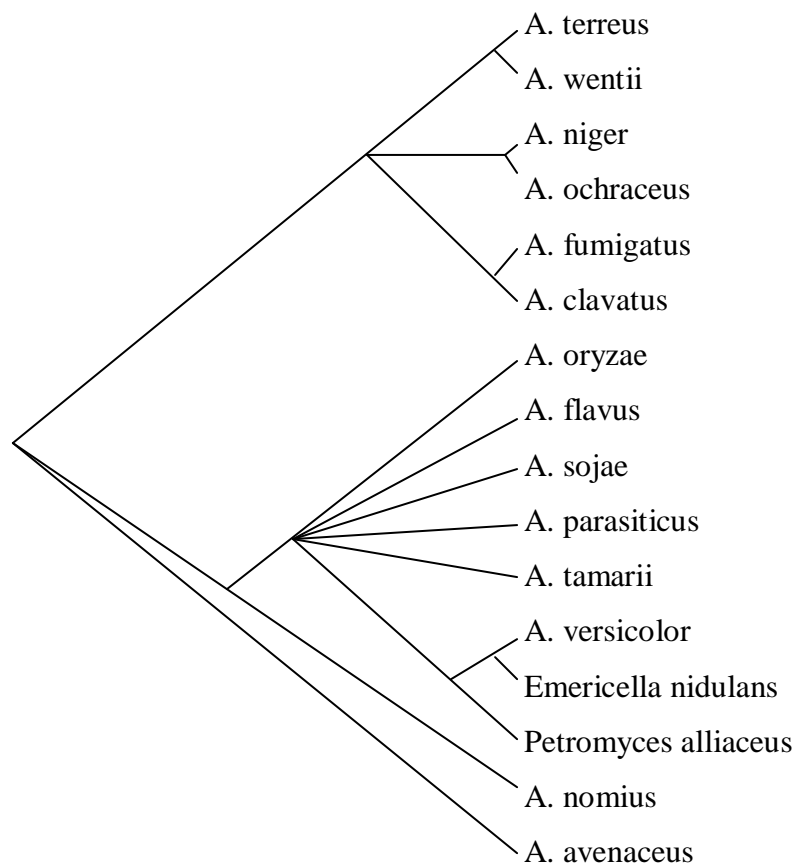
1.1 Οι ασπέργιλλοι

1.1.1 Ταξινόμηση

1.1.1.1 Το γένος *Aspergillus*

Το γένος *Aspergillus* κατατάσσεται στους Ασκομύκητες και περιλαμβάνει τόσο είδη χωρίς γνωστό τελεομορφικό στάδιο, όσο και είδη με τελεομορφικό στάδιο. Παρόλο που προηγούμενα συστήματα κατάταξης είχαν εντάξει τα μη φυλετικά διαφοροποιημένα είδη, όπως ο *A. flavus*, στο φύλο Δευτερομύκητες, εκτίμηση της υπερδομής, και των φυσιολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών, καθώς και αναλύσεις της ακολουθίας του DNA, χρησιμοποιήθηκαν για να τοποθετήσουν τα είδη αυτά ανάμεσα στους πλησιέστερους φυλετικά διαφοροποιημένους συγγενείς τους (Alexopoulos και συν., 1996). Οι Raper και Fennell (1965) διαίρεσαν το γένος *Aspergillus* σε 18 ομάδες, που στη συνέχεια τροποποιήθηκαν σε 6 υπογένη και 18 τμήματα (Gams και συν., 1985). Η κατάταξη αυτή βασίστηκε στη μορφολογία, και πρόσφατες μελέτες εστιάζουν στη σύγκριση αυτής της κλασικής ταξινόμησης με μοριακά φυλογενετικά δεδομένα. Ο Peterson (2000) χρησιμοποίησε μεγάλες υπομονάδες γονιδίων ριβοσωμικού RNA, από 215 είδη *Aspergillus*, συμπεριλαμβάνοντας εκπροσώπους από τα 6 υπογένη και τα 18 τμήματα, για να εξετάσει τις φυλογενετικές συγγένειες μέσα στο γένος. Το υπάρχον σύστημα ταξινόμησης, που περιέχει τα 6 υπογένη *Aspergillus*, *Fumigati*, *Ornati*, *Clavati*, *Nidulantes*, και *Circumdati*, δεν υποστήριξε τις φυλογενετικές συγγένειες που ταυτοποιήθηκαν στη μελέτη του Peterson. Ως εκ τούτου, ο Peterson προτείνει μια μονοφυλετική ταξινόμηση, που εντάσσει 15 τμήματα σε 3 υπογένη: *Aspergillus*, *Fumigati*, και *Nidulantes*. Οι Tamura και συν. (2000) έκαναν παρόμοιες φυλογενετικές αναλύσεις, χρησιμοποιώντας ακολουθίες ριβοσωμικού RNA 18S (Svedberg units) από τα 6 υπογένη και 18 τμήματα του γένους *Aspergillus*. Κατέληξαν επίσης στο ότι το γένος *Aspergillus* αποτελείται από 3 διαφορετικές εξελικτικές γραμμές, και πρότειναν η τρέχουσα ταξινόμηση του γένους να αναδομηθεί έτσι, ώστε να αντανakλά τις φυλογενετικές συγγένειες που έχουν παρατηρηθεί. Οι φυλογενετικές συγγένειες συγκεκριμένων ειδών *Aspergillus* και τα συγγενεύοντα τελεόμορφά τους, όπως καθορίζονται από συγκρίσεις των ακολουθιών 18S του ριβοσωμικού RNA, παρουσιάζονται στο σχήμα 1.1 (Peterson, 2000). Στο σχήμα αυτό, φαίνεται ότι τα είδη *A. flavus* και *A. parasiticus* ομαδοποιούνται μαζί, και είναι πιο κοντά συγγενικά με το είδος *A. nidulans*, παρά με το είδος *A. fumigatus*. Πληροφορίες σαν την παραπάνω, μπορεί να είναι χρήσιμες σε γενετικές αναλύσεις. Για παράδειγμα, μπορεί εύκολα να

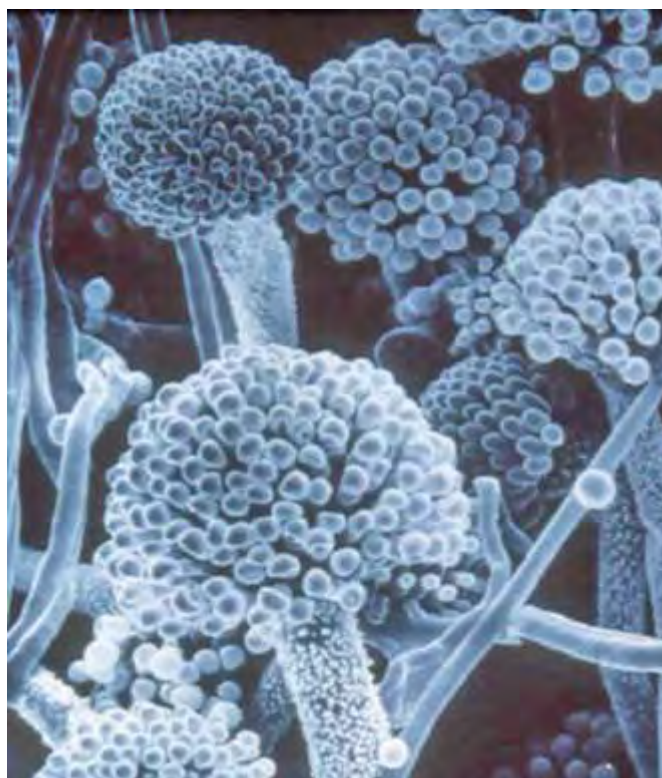
προβλεφθεί, με βάση τα τρέχοντα φυλογενετικά δεδομένα, ότι γονίδια που έχουν βρεθεί στα είδη *A. nidulans* και *A. parasiticus*, θα υπάρχουν και στο είδος *A. flavus*.



Σχήμα 1.1. Μοριακή φυλογένεια των ειδών *Aspergillus* και τα σχετιζόμενα τελεόμορφα τους (Peterson, 2000)

Οι μύκητες του γένους *Aspergillus* είναι ευρέως διαδεδομένοι γεωγραφικά, και μπορούν να είναι είτε επωφελείς, είτε επιβλαβείς, ανάλογα με το είδος και με το υπόστρωμα που χρησιμοποιούν. Στη βιομηχανία, τα είδη *Aspergillus* χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενζύμων και οργανικών οξέων, έκφραση "ξένων" πρωτεϊνών, και ζύμωση τροφίμων. Στη φύση, τα περισσότερα μέλη του γένους αυτού βρίσκονται στο έδαφος, όπου συμβάλλουν στην αποδόμηση αβιοτικών υποστρωμάτων. Τα είδη *Aspergillus*, ακόμα, απομονώνονται συχνά ως επιμολυντές τροφίμων. Τα παθογόνα είδη είναι επιβλαβή, όχι μόνο μέσω της διαδικασίας της μόλυνσης και του εποικισμού, αλλά και διότι ένας αριθμός αυτών παράγει τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες στους ιστούς των ξενιστών. Τα είδη του γένους *Aspergillus* έχουν ταυτοποιηθεί ως παθογόνα σε φυτά, έντομα και ζώα. Μερικά από τα πιο σημαντικά είδη είναι : ο *A. fumigatus* (υπογένο

Fumigati, τμήμα *Fumigati*), αιτιολογικός παράγοντας της ασπεργίλλωσης στον άνθρωπο, ο *Aspergillus niger* (υπογένος *Aspergillus*, τμήμα *Nigri*), που χρησιμοποιείται για την παραγωγή κιτρικού οξέως στη βιομηχανία, ο *A. oryzae* (υπογένος *Aspergillus*, τμήμα *Flavi*), που χρησιμοποιείται για την παρασκευή σάκε και σάλτσας σόγιας, ο *A. nidulans* (τελεόμορφο *Emericella nidulans*, υπογένος *Nidulantes*, τμήμα *Nidulantes*), πρότυπο "σύστημα" στη γενετική των μυκήτων, ο *A. terreus* (υπογένος *Aspergillus*, τμήμα *Terrei*), είδος συχνά χρησιμοποιούμενο σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές, και ο *A. flavus* (υπογένος *Aspergillus*, τμήμα *Flavi*), παθογόνο σε φυτά, έντομα, ζώα, και "παραγωγός" αφλατοξινών (Bennett, 2010). Από όλες τις ομάδες των ειδών του γένους *Aspergillus*, το τμήμα *Flavi* στο υπογένος *Aspergillus* έχει προκαλέσει το περισσότερο ενδιαφέρον, λόγω των επιπτώσεών του στη βιομηχανία, στην οικονομία, και στην υγεία των ζώων και του ανθρώπου (εικόνα 1.1). Αυτή η σημαντική ομάδα μυκήτων θα συζητηθεί λεπτομερειακά στη συνέχεια.



Εικόνα 1.1. Κονιδιοφόρος δομή του *Aspergillus flavus*

1.1.1.2 *Aspergillus* τμήμα *Flavi*

Η ποικιλία των οικολογικών πτυχών που καταλαμβάνουν τα μέλη του *Aspergillus*, υπογένος *Aspergillus*, τμήμα *Flavi* (ομάδα *A. flavus*), και η ικανότητα μερικών ειδών να παράγουν αφλατοξίνες, καθιστούν τη συγκεκριμένη ομάδα μυκήτων μια από τις πιο μελετημένες μέχρι σήμερα. Τα είδη του τμήματος *Flavi* απαντώνται στη φύση, ως σαπρόφυτα του εδάφους και φυτικών οργανισμών σε αποσύνθεση, ή ως παράσιτα σε φυτά, έντομα και ζώα. Μη αφλατοξινογόνα είδη, όπως ο *A. oryzae* και ο *A. sojae*, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιομηχανία για ζύμωση τροφίμων ή την παραγωγή ενζύμων (Geiser και συν., 1998). Στο πεδίο της γεωργίας, τα είδη *A. flavus* και *A. parasiticus* ξεχωρίζουν, εξαιτίας του ρόλου τους ως φυτοπαθογόνα και της ικανότητάς τους να παράγουν αφλατοξίνες στα μολυσμένα τμήματα των φυτών. Οι μελέτες των ειδών της ομάδας του *A. flavus* έχουν απασχολήσει ερευνητές με ευρύ φάσμα ενδιαφερόντων, όπως είναι η ιατρική, η οικολογία, η γονιδιωματική, η εντομολογία, η γενετική φυτών, η τοξικολογία, η οικονομία, η μυκολογία, και η παθολογία των φυτών.

Η ταξινόμηση των διαφόρων ειδών μυκήτων είναι συχνά αντικείμενο αντιπαράθεσων, και ένας αριθμός χαρακτηριστικών έχει χρησιμοποιηθεί, για να καθοριστεί η κατάλληλη ταξονομική ομαδοποίηση μέσα στο τμήμα *Flavi*. Όταν το τμήμα αυτό περιγράφηκε από τους Raper και Fennell (1965), μόνο 9 είδη διαπιστώθηκαν. Ένα συνοπτικό "κλειδί", που δημοσιεύτηκε από τον Christensen (1981), περιλαμβάνει μια ταξονομική περιγραφή 16 ειδών και 4 ποικιλιών. Το κλειδί παρέχει μια εξονυχιστική εξέταση αποικιακών και μορφολογικών χαρακτηριστικών, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ταυτοποιηθούν τα είδη στην ομάδα του *A. flavus*, και να διαφοροποιηθεί η ομάδα αυτή από άλλες ομάδες μυκήτων με παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά. Τα κύρια χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση, είναι ο χρωματισμός της κεφαλής του κονιδίου, η ανάπτυξη στους 37°C, και οι διαστάσεις των κονιδιοφόρων, των κύστεων, και των κονιδίων. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, κατά την εξέταση της εξέλιξης στο τμήμα *Flavi*, οι Rigo και συν. (2002) επεσήμαναν 23 είδη και υποείδη, τα οποία είτε ανήκαν στο τμήμα, είτε ανήκαν σε στενά συγγενικά τμήματα. Με βάση τα αποτελέσματά τους, πρότειναν τα είδη *A. clavatoflavus* και *A. zonatus* να μην ανήκουν στο τμήμα *Flavi*. Αυτά τα 2 είδη επιδεικνύουν υψηλή ομολογία αλληλουχιών μεταξύ τους, αλλά φαίνεται να μη συγγενεύουν με άλλα είδη της ομάδας του *A. flavus*. Αυτή η ταξονομική μετακίνηση είχε προταθεί επίσης σε μια προγενέστερη μελέτη του Peterson (2000), που βρήκε ότι τα είδη *A. clavatoflavus* και *A. zonatus* διακρίνονται φυλογενετικά από το τμήμα *Flavi*. Επιπρόσθετα, ο *Petromyces alliaceus*, και άλλοι 3

μύκητες, που προηγούμενα είχαν ενταχθεί στο τμήμα *Wentii*, οι *A. thomii*, *A. terricola*, και *A. terricola* var. *Americana*, έχουν πλέον μεταφερθεί στο τμήμα *Flavi* (Peterson, 1995). Είναι πολύ πιθανό, τέτοιες αναθεωρήσεις στην ταξινόμηση των ειδών που ανήκουν στην ομάδα του *Aspergillus flavus* να συνεχίσουν να εμφανίζονται, καθώς οι ερευνητές προσπαθούν να αναπτύξουν μια "καθαρή" ταξινόμηση ειδών για τους μη φυλετικά διαφοροποιημένους μύκητες. Ο καθορισμός των ειδών στο τμήμα *Flavi* είναι πλέον βασισμένος στη μορφολογία, στα χαρακτηριστικά των μυκοτοξινών, και στις αναλύσεις των αλληλουχιών του DNA (Ito και συν., 2001). Αυτά τα κριτήρια κάποιες φορές δημιουργούν αντιπαραθέσεις όσον αφορά στην ταυτοποίηση και ταξινόμηση των ειδών, και καθιστούν δύσκολο να καθοριστεί ακριβώς πόσα είδη πρέπει να συμπεριληφθούν στο τμήμα.

1.1.1.3 Παραγωγή μυκοτοξινών από τα είδη του τμήματος *Flavi*

Ίσως το πιο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των ασπέργιλλων που ανήκουν στο τμήμα *Flavi*, είναι η ικανότητα κάποιων ειδών να παράγουν αφλατοξίνες, κατά τη διάρκεια δευτερογενούς μεταβολισμού. Από τα είδη που έχουν καταταγεί στο τμήμα *Flavi*, μόνο τα *A. flavus*, *A. parasiticus*, και *A. nomius* έχουν αναγνωριστεί ευρέως ως παραγωγοί αφλατοξινών. Πρόσφατες αναφορές έχουν περιγράψει παραγωγή αφλατοξινών από 2 νέα είδη που ανήκουν στο τμήμα *Flavi*. Σε μια έκθεση το 1996 από τους Goto και συν. (1996), παρατηρήθηκε παραγωγή αφλατοξίνης από τον *Aspergillus tamari*. Αυτό το είδος έχει βρεθεί ότι περιέχει τόσο αφλατοξινογόνα, όσο και μη αφλατοξινογόνα στελέχη, και έτσι, προτρέπεται η κατάταξη των αφλατοξινογόνων στελεχών σε ένα νέο είδος μέσα στο τμήμα *Flavi* : το *Aspergillus pseudotamarii*. Ο *A. pseudotamarii* διαφέρει από τον *A. tamari*, τόσο μορφολογικά και γενετικά, όσο και στην ικανότητά του να παράγει αφλατοξίνες. Το 2001, ο *Aspergillus bombycis* περιγράφηκε ως νέο είδος στο τμήμα *Flavi*, που είναι πολύ κοντά συγγενικά με τον *A. nomius*, με βάση φυλογενετικές συγκρίσεις αλληλουχιών DNA (Peterson και συν., 2001). Μορφολογικά, ο *Aspergillus bombycis* μοιάζει με τον *A. flavus*, ωστόσο τα δύο είδη μπορούν να διακριθούν με σύγκριση των καμπυλών ανάπτυξης και των χαρακτηριστικών μυκοτοξίνης που παράγουν. Με βάση νεότερες εξελίξεις, μια περιληπτική λίστα των αφλατοξινογόνων ειδών μέσα στο *Aspergillus* τμήμα *Flavi*, περιλαμβάνει τα είδη : *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, και *A. bombycis*. Ο πίνακας 1.1 (Tamura και συν., 2000· Peterson, 1995· Samson, 2001· Varga και συν., 2003) αναφέρεται στις κοινά παραγόμενες μυκοτοξίνες από μερικά είδη του τμήματος *Flavi*, κατά τη διάρκεια

δευτερογενούς μεταβολισμού. Η παραγωγή αφλατοξινών έχει αναφερθεί σε πολλά είδη, συμπεριλαμβανομένου του *A. wentii* (Schroeder και Verrett, 1969), και, πιο πρόσφατα, του *A. ochraceoroseus*. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η παραγωγή μυκοτοξινών, εννοείται και αφλατοξινών, μπορεί να μην είναι ευρέως διαδεδομένη μέσα σε ένα είδος. Επίσης, ένας αριθμός αναφορών δεν έχουν επιβεβαιωθεί, ή αφορούν στελέχη που έχουν ταυτοποιηθεί λανθασμένα. Ωστόσο, έχοντας ως δεδομένο ότι πολλοί μύκητες, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που δεν ανήκουν στο γένος *Aspergillus*, παράγουν στεριγματοκυστίνη (τοξικός μεταβολίτης, με δομή που προσεγγίζει κατά πολύ εκείνη των αφλατοξινών) (Barnes και συν., 1994), είναι εύκολο να γίνει αντιληπτό ότι η παραγωγή αφλατοξινών μελλοντικά θα επιβεβαιωθεί και σε άλλα είδη αυτού του γένους.

Οι *Aspergillus flavus* και *A. parasiticus* είναι τα πιο σημαντικά τοξινογόνα είδη στην ομάδα του *A. flavus*. Ενώ και τα δύο είδη συσσωρεύουν μυκοτοξίνες στα τρόφιμα, οι τύποι των τοξινών που παράγουν είναι κάπως διαφορετικοί. Η πλειοψηφία των στελεχών του *A. flavus* που απομονώνονται, παράγουν αφλατοξίνες B₁ (AFB₁) και B₂ (AFB₂), και κυκλοπιαζονικό οξύ (cyclopiazonic acid-CPA), ενώ έχουν ταυτοποιηθεί και κάποια στελέχη που παράγουν επίσης τις αφλατοξίνες G₁ (AFG₁) και G₂ (AFG₂) (Cardwell και Cotty, 2002· Geiser και συν., 2000). Αντίθετα, ο *A. parasiticus* παράγει και τις 4 αφλατοξίνες (B₁, B₂, G₁, G₂), αλλά όχι κυκλοπιαζονικό οξύ. Όλες αυτές οι μυκοτοξίνες είναι δυνητικά επιβλαβείς, αν καταναλωθούν από τον άνθρωπο. Οι AFB₁ και AFB₂ έχουν περιγραφεί ως καρκινογόνες, τερατογόνες και ανοσοκατασταλτικές, και έχουν συνδεθεί με κίρρωση του ήπατος, και οξεία ηπατική βλάβη. Οι AFG₁ και AFG₂ έχουν παρόμοιες επιδράσεις, και η τοξικότητα της αφλατοξίνης G₁ κατατάσσεται αμέσως κάτω από την αντίστοιχη της B₁ (Bhatnagar και συν., 2000). Γαλακτοκομικά προϊόντα από ζώα που τρέφονται με ζωοτροφές μολυσμένες με αφλατοξίνη, ενδέχεται να περιέχουν τους τύπους αφλατοξίνης M₁ και M₂. Το κυκλοπιαζονικό οξύ έχει επίσης ανιχνευτεί σε γεωργικά προϊόντα, και συνδέεται με γαστρεντερικές και νευρολογικές διαταραχές σε πειραματόζωα (Bhatnagar και συν., 2000· Bryden, 1991). Περιορισμένες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για τη συσσώρευση κυκλοπιαζονικού οξέως και άλλων δευτερογενών μεταβολιτών, σε σύγκριση με τις αμέτρητες μελέτες πάνω στα επίπεδα αφλατοξινών στα τρόφιμα. Κατά συνέπεια, ο Αμερικανικός Διαχειριστικός Οργανισμός για τα Τρόφιμα και τα Φάρμακα (U.S. Food and Drug Administration-FDA), έχει θεσπίσει νομοθετικό όριο μόνο για τις αφλατοξίνες B₁, B₂, G₁, και G₂, στα τρόφιμα που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο και τις ζωοτροφές, που ανέρχεται στο

επίπεδο των 20 µg/kg, καθώς και για την αφλατοξίνη M₁, ενός μεταβολίτη της B₁ στο γάλα, που ανέρχεται στο 0,5 µg/kg. Μια έκθεση που εκδόθηκε από τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization-FAO), και αφορά στους κανονισμούς που εφαρμόζονται παγκόσμια για τις μυκοτοξίνες από την 1^η Οκτωβρίου του 1996, καταδεικνύει ότι 77 χώρες είχαν κανονισμούς, 13 χώρες δεν είχαν, ενώ δεν υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα για 50 χώρες (FAO, 1997). Άλλη μια έκθεση του FAO, που εκδόθηκε το 2003, παρέχει κανονισμούς για τις μυκοτοξίνες σε περισσότερες από 100 χώρες, καθώς και ενοποιημένους κανονισμούς που επιβάλλονται στα κράτη-μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Πίνακας 1.1. Παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών από διάφορα είδη στο *Aspergillus* τμήμα Flavi (Tamura και συν., 2000; Peterson, 1995; Samson, 2001; Varga και συν., 2003)

Είδη	Αφλατοξίνες	Άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες
<i>Aspergillus avenaceus</i>	-	Αβενασιολίδη
<i>Aspergillus bombycis</i>	B, G	Kojic οξύ
<i>Aspergillus caelatus</i>	-	Kojic οξύ
<i>Aspergillus flavus</i>	B, G	Ασπεργιλλικό οξύ, κυκλοπιαζονικό οξύ, kojic οξύ, νομινίνη, πασπαλίνη, πασπαλινίνη
<i>Aspergillus lanosus</i>	-	Γκριζεοφουλβίνη, kojic οξύ, met I
<i>Aspergillus leporis</i>	-	Αντιβιοτικό Υ, kojic οξύ, λεπορίνη, ψευροτίνη
<i>Aspergillus nomius</i>	B, G	Ασπεργιλλικό οξύ, kojic οξύ, νομινίνη, ψευροτίνη, τενοαζονικό οξύ
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	Κυκλοπιαζονικό οξύ, kojic οξύ
<i>Aspergillus parasiticus</i>	B, G	Ασπεργιλλικό οξύ, kojic οξύ, παρασιτικόλη, παρασιτικόλιδη Α
<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	B	Κυκλοπιαζονικό οξύ, kojic οξύ
<i>Aspergillus sojae</i>	-	Kojic οξύ
<i>Aspergillus tamarii</i>	-	Κυκλοπιαζονικό οξύ, φουμγκακλαβίνη Α, kojic οξύ
<i>Aspergillus alliaceus</i>	-	Ασπερλίσίνη, kojic οξύ, κοτανίνες, met I, νομινίνη, ωχρατοξίνη Α και Β, πασπαλίνη

1.1.2 Βιολογία του πληθυσμού

Όσες φορές οι επιστήμονες αναζήτησαν τα είδη των μυκήτων του γένους *Aspergillus*, τα βρήκαν. Τα μέλη του γένους αυτού έχουν περιγραφεί ως πανταχού παρόντα, και ο όρος αυτός βρίσκει εφαρμογή τόσο στη χρησιμοποίηση υποστρωμάτων, όσο και στη γεωγραφική διασπορά. Οι Klich και συν., (1992) ερεύνησαν την οικολογία των ειδών *Aspergillus*, συνδυάζοντας δεδομένα από 327 μελέτες πάνω στη μυκητιακή χλωρίδα του εδάφους και άλλων υποστρωμάτων. Βρήκαν ότι ο *A. flavus* απομονώθηκε σε όλα τα γεωγραφικά πλάτη, αλλά βρέθηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα σε κλίματα ξηρά (ερημικά), και σε γεωγραφικά πλάτη που κυμαίνονταν μεταξύ 26 και 35°. Αυτό το εύρος γεωγραφικού πλάτους αντιπροσωπεύει τροπικά, υποτροπικά, και θερμά εύκρατα κλίματα. Με βάση τις μελέτες που αναφέρθηκαν παραπάνω, ο *A. flavus* είναι ικανός να προσαρμοστεί σε ένα μεγάλο εύρος κλιμάτων, φυσικού περιβάλλοντος, και υποστρωμάτων. Κάποια από τα υποστρώματα που έχει βρεθεί ότι αποικίζει, περιλαμβάνουν ιστούς πτηνών και θηλαστικών, εδάφη, αποθηκευμένα σιτηρά, και σπόρους, ζωοτροφές, βαμβάκι, και δέρμα. Το είδος αυτό έχει επιπρόσθετα αναγνωριστεί ως παθογόνο στα έντομα, και ως επιμολυντής του koji (μαγειρευμένο ρύζι και/ή σπόρους σόγιας, που έχουν ενοφθαλμιστεί με τον μύκητα *A. oryzae*) (Gupta και Gopal, 2002· Christensen, 1981· St. Leger και συν., 2000). Άλλα είδη του τμήματος *Flavi*, που επιδεικνύουν υψηλά επίπεδα προσαρμοστικότητας σε θερμοκρασιακά εύρη και χρήση υποστρωμάτων, είναι τα: *A. oryzae*, *A. parasiticus*, και *A. tamarii* (Klich και συν., 1992).

1.1.2.1 Διάκριση σε στελέχη S και L

Καθώς εξετάζουμε την οικολογία του *A. flavus*, είναι σκόπιμο να σχολιαστούν κάποιες από τις παραλλαγές που παρατηρούνται ανάμεσα σε διάφορες ομάδες του μύκητα αυτού, και στη διάκριση μεταξύ τους. Τα διάφορα στελέχη έχουν χαρακτηριστεί μορφολογικά, με βάση το μέγεθος του σκληρωτίου, και γενετικά, με βάση τις βλαστικές ομάδες συμβατότητας (Vegetative Compatibility Groups-VCGs). Σε μελέτες της μορφολογίας, τα γράμματα S (Small) και L (Large) έχουν χρησιμοποιηθεί για να περιγράψουν στελέχη με πολυάριθμα μικρά (S), ή λίγα μεγάλα (L) όμως σκληρώτια, αντίστοιχα. Σε μια μελέτη που διενεργήθηκε στη Δυτική Αφρική, 44 διαφορετικές καλλιέργειες αραβοσίτου εξετάστηκαν για την παρουσία *A. flavus*. Όλα τα εδάφη περιείχαν *A. flavus*, αλλά περισσότερα στελέχη-L βρέθηκαν σε περιοχές του νότου, ενώ περισσότερα στελέχη-S βρέθηκαν σε περιοχές του βορρά. Η μελέτη, επίσης, επισήμανε ότι μόνο το 44% των L-στελεχών παρήγαγε αφλατοξίνες (μόνο B), ενώ όλα τα S-

στελέχη παρήγαγαν τόσο B όσο και G αφλατοξίνες (Cardwell και Cotty, 2002). Δειγματοληψία εδαφών από μια διατομή που ξεκινά από το ανατολικό Νέο Μεξικό, διέρχεται από την πολιτεία της Τζόρτζια, και καταλήγει στην ανατολική Βιρτζίνια, αποκάλυψε ότι τα περισσότερα απομονωθέντα *A. flavus* ήταν στελέχη-L, και ότι τα υψηλότερα επίπεδα στελεχών-S ήταν παρόντα σε περιοχές του ανατολικο-κεντρικού Τέξας και της Λουιζιάνα, όπου το βαμβάκι είναι η κύρια καλλιέργεια (Horn και Dörner, 1998). Τα απομονωθέντα στελέχη από την παραπάνω μελέτη δεν εξετάστηκαν για την παραγωγή αφλατοξινών. Οι Geiser και συν. (2000), χρησιμοποιώντας στελέχη που συλλέχθηκαν από όλο τον κόσμο, εντόπισαν παραλλαγές μεταξύ των στελεχών-S, καθώς παρατήρησαν ότι κάποια από αυτά τα στελέχη παρήγαγαν αφλατοξίνες G, ενώ άλλα όχι. Ως εκ τούτου, ενώ ο διαχωρισμός των στελεχών σε S και L είναι ένας απλός τρόπος για να ομαδοποιηθούν οι μύκητες *A. flavus* που απομονώνονται, αυτή η μέθοδος ταξινόμησης δεν μπορεί να οδηγήσει σε γενικευμένα συμπεράσματα, όσον αφορά στην ικανότητά τους να παράγουν αφλατοξίνες. Σχετικά με τη γεωγραφική κατανομή, στελέχη S και L έχουν απομονωθεί από τοποθεσίες σε όλο τον πλανήτη, αλλά παρατηρήθηκαν έκδηλες διαφορές στη συχνότητα με την οποία κάθε ομάδα εμφανίζεται σε κάθε περιοχή.

Γενικά, τα S στελέχη παράγουν περισσότερες ποσότητες αφλατοξινών. Τα L στελέχη παράγουν άφθονα κονίδια και σκληρώτια, τα οποία έχουν διάμετρο συνήθως >400 μm, ενώ τα S στελέχη παράγουν λιγότερα κονίδια και πολλά σκληρώτια, με διάμετρο συνήθως <400 μm. Το γονιδιακό σύμπλεγμα για τη βιοσύνθεση αφλατοξινών των L και S στελεχών του *A. flavus* είναι κατά 99% ταυτόσημο, σε επίπεδο νουκλεοτιδίων.

1.1.2.2 Βλαστικές ομάδες συμβατότητας (Vegetative Compatibility Groups-VCGs)

Η γενετική ταξινόμηση βασισμένη στις VCGs έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς, για να εξεταστούν πληθυσμοί του είδους *A. flavus*. Οι VCGs είναι ομάδες μυκήτων που μπορούν να σχηματίσουν ετεροκάρυα (κύτταρο με 2 πυρήνες, από 2 γενετικά διαφορετικά κύτταρα), μέσω αναστόμωσης των υφών τους ή σύντηξη. Σε μύκητες όπως ο *A. flavus*, στελέχη που ανήκουν στο ίδιο VCG συνήθως έχουν παρόμοια μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, υπάρχουν σημαντικές παραλλαγές ανάμεσα στα VCGs, όπως οι ερευνητές έχουν καταλήξει, μέσα από αναλύσεις της παραγωγής μυκοτοξινών, τη μορφολογία, μοτίβα ισοενζύμων, τυχαίο πολλαπλασιασμό πολυμορφικού DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA-RAPD), αυξητικό πολυμορφισμό περιορισμού θραυσμάτων (Restriction Fragment Length Polymorphism-

RFLP), και αλληλουχίες DNA (Geiser και συν., 2000· Horn και συν., 1996). Σε μια μελέτη της μορφολογίας και της παραγωγής μυκοτοξινών σε VCGs του *A. flavus*, σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν ανάμεσα σε VCGs, που αφορούσαν στη γενική εμφάνιση της αποικίας, στη μορφολογία των σκληρωτίων (αριθμός, όγκος, σχήμα), και στην παραγωγή αφλατοξινών B₁ και B₂, κυκλοπιαζονικού οξέος, και Kojic οξέος (παράγεται κυρίως από τον *A. oryzae*, και χρησιμοποιείται στη ζύμωση ρυζιού για την παραγωγή σάκε) (Horn και συν., 1996). Οι Bayman και Cotty (1993) παρατήρησαν επίσης μια σύνδεση των VCGs με το μέγεθος του σκληρωτίου και την παραγωγή αφλατοξίνης. Παρόλο που πολλά από τα παραπάνω χαρακτηριστικά έχουν αποδειχτεί στατιστικά διαφορετικά μεταξύ των VCGs, μέχρι σήμερα κανένα δεν έχει χρησιμοποιηθεί για να εκτιμηθεί πλήρως η ποικιλία των VCGs που υφίστανται στον *A. flavus*, ή οι εξελικτικές συγγένειες μεταξύ των VCGs. Οι McAlpin και συν. (2002), πρόσφατα απέδειξαν την ικανότητα μιας έλικας DNA να ξεχωρίσει μεταξύ VCGs, βασιζόμενοι στο αποτύπωμα του DNA. Παρότι η δουλειά τους περιορίστηκε σε στελέχη απομονωθέντα από μια μόνο φιστικοκαλλιέργεια, η τεχνική αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε μια πιο ευρεία κλίμακα, για να εκτιμηθούν πληθυσμοί του *A. flavus* από διαφορετικές τοποθεσίες ανά τον κόσμο.

Ένας σημαντικός αριθμός μελετών έχει αποδείξει σημαντικές παραλλαγές των VCGs του *A. flavus*, ακόμα και μέσα σε περιοχές τόσο μικρές όσο μια βαμβάκοκαλλιέργεια (Bayman και Cotty, 1991). Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι ένας μύκητας που περνά το μεγαλύτερο κομμάτι της ζωής του ως σαπρόφυτο του εδάφους, εμφανίζει τόσο ταχέως μεταβαλλόμενους πληθυσμούς. Παρατηρήσεις υψηλών επιπέδων παραλλαγών και αλματωδών αλλαγών στα προφίλ VCG, οδήγησαν τους ερευνητές να αξιώσουν ότι τα αερομεταφερόμενα κονίδια του *A. flavus* ενδέχεται να ευθύνονται για τις δραματικές αυτές αλλαγές στη δομή του πληθυσμού (Bayman και Cotty, 1991). Εναλλακτικά, πιθανόν η ποικιλομορφία των πληθυσμών του *A. flavus* να οφείλεται μερικώς σε περιστατικά ανασυνδυασμού που λαμβάνουν χώρα κάτω από την επιφάνεια του εδάφους. Μιτωτικός ανασυνδυασμός, που μέχρι στιγμής έχει παρατηρηθεί μόνο στο εργαστήριο, ως στάδιο του μονογονικού κύκλου αναπαραγωγής, μπορεί να συμβαίνει στο έδαφος, μεταξύ γενετικά παρόμοιων ατόμων. Παρόλο που δεν έχει παρατηρηθεί φυλετικό στάδιο αναπαραγωγής, υπάρχουν αρκετές εκθέσεις που υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός ισχυρού κλωνικού συστατικού στην εξελικτική ιστορία των μυκήτων (Geiser και συν., 1998· Novas και Cabral, 2002), ενώ υπάρχει ακόμα και το ενδεχόμενο για μειωτικό ανασυνδυασμό. Όπως υποστηρίζεται από τους Horn και συν. (1996),

μπορεί να είναι η δυναμική και η πολυπλοκότητα του εδάφους εκείνη που υπαγορεύει τη μεγαλύτερη επιλεκτική πίεση, περισσότερο από την παθογόνο φάση του φυτού στον κύκλο ζωής του *A. flavus*.

1.1.3 Οικολογία του *A. flavus*

1.1.3.1 Κύκλος ζωής – Παθογόνος δράση

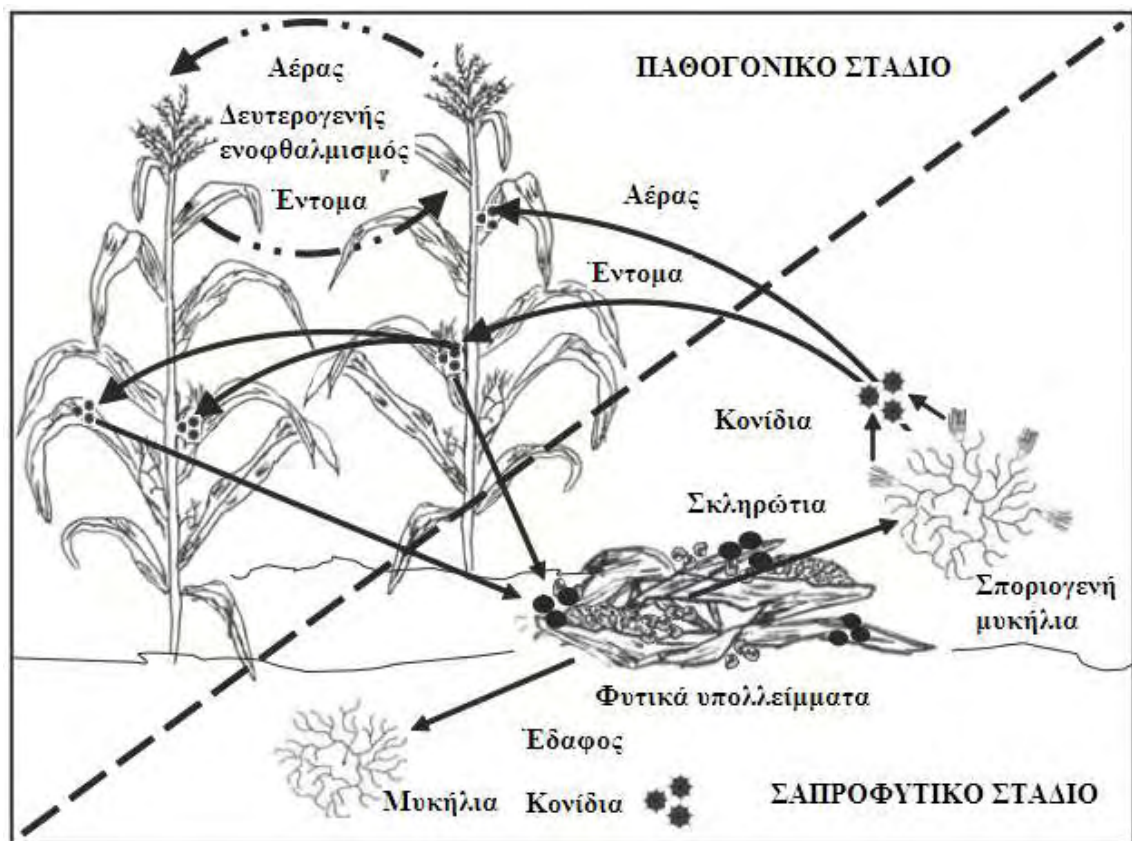
Παρόλο που ο *A. flavus* είναι ικανός να αναπτυχθεί σχεδόν σε οποιαδήποτε αποθηκευμένη σοδειά ή έτοιμο προϊόν τροφίμου, αποτελεί μείζον πρόβλημα κυρίως για το καλαμπόκι, το βαμβακόσπορο, τα αράπικα φιστίκια, και ξηρούς καρπούς, όπως καρύδια, κάσιους, κάστανα, φουντούκια, μακαντέμια, πέκαν, κουκουνάρια, φιστίκια Αιγίνης (Prandini και συν., 2009· Finley και συν., 1992). Ο μύκητας είναι πασίγνωστος για την επιθετικότητά του στην αποσύνθεση των αποθηκευμένων τροφών, και την ικανότητά του να παράγει αφλατοξίνες σε σπόρους και σιτηρά που έχει αποικίσει (Rustom, 1997). Ωστόσο, η μόλυνση με *A. flavus* και η παραγωγή αφλατοξίνης αποτελεί συχνά πρόβλημα αρκετά πριν τη συγκομιδή (Moss, 1989). Τα επίπεδα αφλατοξίνης έχουν οριοθετηθεί νομοθετικά στα τρόφιμα, και η μόλυνση πριν τη συγκομιδή, ακόμα και σε ένα αναλογικά μικρό κομμάτι φυτικού ιστού, μπορεί να συνεπάγεται απόρριψη όλης της σοδειάς. Η προ της συγκομιδής μόλυνση έχει παρατηρηθεί στις προαναφερόμενες καλλιέργειες, αλλά η περισσότερη έρευνα για τη διαδικασία της μόλυνσης έχει πραγματοποιηθεί με τον *A. flavus* στο καλαμπόκι. Ως εκ τούτου, η συζήτηση που θα ακολουθήσει για την παθογόνο δράση και τον κύκλο ζωής του *A. flavus*, αντλεί συμπεράσματα από μελέτες πάνω στη μόλυνση των καλλιεργειών καλαμποκιού πριν τη συγκομιδή.

Η παθογόνος ικανότητα του *A. flavus* είναι υψηλής σημασίας, από γεωργική και οικονομική σκοπιά, αλλά μπορεί στην πραγματικότητα να είναι ήσσονος σημασίας στην οικολογία του μύκητα (Horn και συν., 1996). Ο *A. flavus* φαίνεται ότι καταναλώνει το μεγαλύτερο μέρος της ζωής του ως σαπρόφυτο του εδάφους. Η ανάπτυξη του μύκητα στο φυσικό του περιβάλλον υποστηρίζεται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία φυτικών και ζωικών υπολειμμάτων. Το μυκήλιο του μύκητα είναι η κυρίαρχη δομή που απαντά στο έδαφος, ωστόσο μπορεί να σχηματιστούν σκληρώτια, συμβάλλοντας στη μακρόχρονη επιβίωση του μύκητα. Ο *A. flavus* δε διαθέτει γνωστό στάδιο φυλετικού διαχωρισμού, οπότε η πρωταρχική μόλυνση λαμβάνει χώρα μέσω της διασποράς και εκβλάστησης των κονιδίων. Πολυάριθμες μελέτες έχουν εξετάσει την επιβίωση και κονιδιακή εκβλάστηση των σκληρωτίων (η παραγωγή κονιδιοφόρων και κονιδίων από

τα σκληρώτια) μέσα στο έδαφος ή σε μολυσμένα μέρη των φυτών. Σε ένα πείραμα για την παραγωγή σκληρωτίων, οι Wicklow και συν. (1982) παρατήρησαν ότι ο *A. flavus* μπορούσε να παράγει σκληρώτια σε πυρήνες καλαμποκιού, οι οποίοι είτε είχαν ενοφθαλμιστεί τεχνητά, είτε είχαν μολυνθεί με φυσικό τρόπο. Οι Wicklow και συν. (1993) ανακάλυψαν ότι η παραγωγή κονιδίων από τα σκληρώτια μειώθηκε σημαντικά, μετά την ταφή τους στο έδαφος για 1 με 2 έτη, αλλά ότι τα σκληρώτια παρέμειναν βιώσιμα ακόμα και μετά από χρόνια ταφής. Ακόμα, παρατήρησαν πολυάριθμα υπολείμματα πολλαπλασιασμού στο έδαφος, που υποδήλωναν κονιδιακή εκβλάστηση από τα σκληρώτια. Προγενέστερη μελέτη από τους Wicklow και Donahue (1984) υποστηρίζει αυτή την παρατήρηση. Οι ερευνητές αυτοί βρήκαν ότι τα σκληρώτια του *A. flavus* παρήγαγαν κονίδια, ύστερα από επώαση σε υγρή άμμο και σε έδαφος χωραφιού, τόσο με, όσο και δίχως προηγούμενη καταβύθιση στην επιφάνεια του εδάφους. Επιπρόσθετα, μια άλλη μελέτη στον αγρό, αποκάλυψε ότι σκληρώτια εκτεθειμένα στην επιφάνεια του εδάφους, βλαστάνουν 8 ημέρες πριν την ημέρα που ο αραβόσιτος δημιουργεί τις μεταξωτές υφές του ("silking date") (Wicklow και Wilson, 1986). Οι μελέτες αυτές αναδεικνύουν τη σημασία των σκληρωτίων ως πηγή πρωταρχικού ενοφθαλμισμού, και παρέχουν αποδεικτικά στοιχεία για φυσική επιλογή υπέρ των στελεχών που είναι ικανά να διατηρήσουν μια επιτυχημένη αλληλεπίδραση ξενιστή-παρασίτου με το καλαμπόκι.

Τα κονίδια που παράγονται από μυκήλιο ή σκληρώτια, εξυπηρετούν ως μέσο πρωταρχικού ενοφθαλμισμού για τις ασθένειες που προκαλούνται από τον *A. flavus*. Τα σπόρια μεταφέρονται με τον αέρα ή τα έντομα σε γειτονικά φυτά. Παρόλο που τα έντομα σαφώς και διαδραματίζουν έναν πρωταρχικό ρόλο στην επιδημιολογία του *A. flavus* (Widstrom, 1996), οι Jones και συν. (1980) υποστηρίζουν ότι ο *A. flavus* είναι ικανός να μολύνει τον αραβόσιτο, ακόμα και σε περιβάλλον απαλλαγμένο από έντομα. Ο μύκητας θα αποικίσει τον ιστό των μεταξωτών υφών και θα αναπτυχθεί κατά μήκος των υφών, μέχρι το στέλεχος του αραβόσιτου, όπου μολύνει τους αναπτυσσόμενους σπόρους. Ο ακριβής τρόπος εισόδου δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος. Ωστόσο, όποια οδός και εάν ακολουθηθεί, το πιθανότερο είναι ότι ο *A. flavus* θα αναπτυχθεί μέσω του φραγμού που είναι πιο εύκολα προσπελάσιμος. Ως εκ τούτου, παρότι δεν είναι απαραίτητα για τη μόλυνση, τα τραύματα που προκαλούν τα έντομα κατά τη θρέψη τους, παρέχουν έναν εύκολο τρόπο εισόδου για την εισβολή του μύκητα. Άπαξ και ο *A. flavus* είναι παρών στο φυτικό ιστό, συνεχίζει να αναπτύσσεται και να παράγει αφλατοξίνες, και τα επίπεδα των τελευταίων σε μη σωστά αποθηκευμένους και

μολυσμένους φυτικούς ιστούς, συνεχίζουν να αυξάνονται αρκετά μετά τη συγκομιδή. Μολονότι αυτό έχει σοβαρές επιπτώσεις για τις προμήθειες τροφίμων και ζωοτροφών, η σαπροφυτική ανάπτυξη πρέπει επίσης να ληφθεί σοβαρά υπόψη στον κύκλο ζωής του παθογόνου αυτού μύκητα. Οι μολυσμένοι φυτικοί ιστοί, όπως οι σπόροι του αραβόσιτου και το φύλλωμα, μπορούν να παραμείνουν στο έδαφος και να συντηρήσουν το μύκητα μέχρι την επόμενη περίοδο, όταν καινούργια μυκήλια ή σκληρώτια αναπτύξουν κονιδιακές δομές, και -επομένως- παράξουν τον πρωταρχικό παράγοντα ενοφθαλμισμού για τον επόμενο κύκλο μόλυνσης (εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2. Ο κύκλος ζωής του *A. flavus* σε σύστημα καλλιέργειας καλαμποκιού (Abbas και συν., 2009)

Παρόλο που τόσο ο *A. flavus*, όσο και ο *A. parasiticus* είναι ικανοί να προκαλέσουν ασθένεια στον αγρό, ο *A. flavus* απομονώνεται πιο συχνά από όλες τις καλλιέργειες (Payne, 1998). Οι Zummo και Scott (1990) σύγκριναν την επιθετικότητα του *A. flavus* με εκείνη του *A. parasiticus* στον αραβόσιτο, και βρήκαν ότι οι δύο μύκητες ήταν ισοδύναμα επιθετικοί σε ενοφθαλμισμένους καρπούς. Η διαφορά τους έγκειται στην αντοχή τους στους χειμερινούς μήνες. Οι μη ενοφθαλμισμένοι κώνοι αραβοσίτου που

αφέθηκαν να περάσουν το χειμώνα περιείχαν κυρίως *A. flavus*, και όλα τα σκληρώτια που συλλέχθηκαν ήταν από τον συγκεκριμένο μύκητα. Άλλη σημαντική παρατήρηση ήταν ότι υψηλότερα επίπεδα κονιδίων του *A. flavus* ήταν παρόντα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού, σε σχέση με τα κονίδια του *A. parasiticus*. Παρόλο που οι δύο μύκητες φαίνεται να είναι παρόμοιοι όσον αφορά στην ικανότητά τους να αποικίζουν ιστούς ξενιστών, ο *A. flavus* είναι πιο επίμονος στην αποδόμηση φυτών, σε σχέση με τον *A. parasiticus*, και επομένως είναι πιο ικανός να παράγει περισσότερα κονίδια στην αρχή της καλλιεργητικής περιόδου.

1.1.3.2 Ο ρόλος των περιβαλλοντικών συνθηκών στην παθογένεια του *A. flavus*

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της παθογένειας. Η ανάπτυξη του *Aspergillus flavus* είναι ιδανική όταν η θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 36 και 38°C. Ταυτόχρονα, θερμοκρασίες πάνω από 30°C προκαλούν θερμική καταπόνηση στο φυτό του καλαμποκιού, δίνοντας στο μύκητα ακόμα μεγαλύτερο πλεονέκτημα (Payne, 1992). Οι ερευνητές παρατήρησαν ακόμα, ότι η μόλυνση με αφλατοξίνη είναι μεγαλύτερη στο χρονικό διάστημα που οι βροχοπτώσεις δεν ξεπερνούν το μέσο όρο. Η καταπόνηση της ξηρασίας οδηγεί σε ρωγμές στην επιφάνεια των σπόρων, παρέχοντας πρόσθετα σημεία εισόδου στις υφές του *A. flavus* (Bhatnagar και συν., 2000). Είναι βασικό να σημειωθεί, ότι οι συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη του *A. flavus* (υψηλή θερμοκρασία, χαμηλή υγρασία) είναι κάτι λιγότερο από ιδανικές για πολλά από τα μικρόβια που τυπικά θα ήταν παρόντα στο έδαφος ή στις επιφάνειες του φυτού. Αυτό τοποθετεί το μύκητα σε ακόμα πλεονεκτικότερη θέση, επιτρέποντάς του να υπερνικήσει εύκολα τους οργανισμούς αυτούς στον ανταγωνισμό για υποστρώματα στο έδαφος ή στο φυτό.

Επίσης, έχει εξεταστεί ο ρόλος του περιβάλλοντος στις επιπτώσεις και τη δριμύτητα του *A. flavus* στη μόλυνση του αράπικου φιστικιού.. Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε για τις επιπτώσεις του ποτίσματος και της καταπόνησης της ξηρασίας στη μόλυνση από αφλατοξίνες, οι Cole και συν. (1982) βρήκαν ότι το πότισμα μείωσε τη θερμοκρασία του εδάφους, παρέχοντας αποτελεσματικό έλεγχο κατά της μόλυνσης του φιστικιού από *A. flavus* και *A. parasiticus*. Ο αραβόσιτος, που εξαρτάται περισσότερο από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος, παρά από εκείνη του εδάφους, δεν έδειξε αξιοσημείωτη μείωση στα επίπεδα μόλυνσης, ως αποτέλεσμα της διαχείρισης του ποτίσματος (Cole και συν., 1982). Η θερμοκρασία του κελύφους του αράπικου φιστικιού είναι ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας στον καθορισμό της έκτασης της

ανάπτυξης του *A. flavus*. Δεν είναι έκπληξη ότι ο αποικισμός των καρπών του φιστικιού και οι συγκεντρώσεις αφλατοξινών αυξάνονταν, καθώς οι θερμοκρασίες πλησίαζαν την ιδανική για την ανάπτυξη του *A. flavus* (Sanders και συν., 1984). Όπως και με το καλαμπόκι, ο τραυματισμός των καρπών δεν είναι απαραίτητος για τη μόλυνση με αφλατοξίνες. Παρ' όλα αυτά, είναι ξεκάθαρο ότι οι τραυματισμένοι καρποί φιστικιού περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα αφλατοξινών (Blankenship και συν., 1984). Οι ραγισμένοι καρποί διαπερνώνονται ευκολότερα από το μύκητα, και μπορεί να αφυδατωθούν, δημιουργώντας ευνοϊκότερο περιβάλλον για τον *A. flavus* (Payne, 1998).

1.2 Οι αφλατοξίνες

1.2.1 Ιστορικά στοιχεία

Το 1960 περισσότερα από 100.000 νεαρά ινδορνίθια, εκτρεφόμενα σε πτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις της Μεγάλης Βρετανίας, πέθαναν μέσα σε χρονικό διάστημα λίγων μηνών, από μια νέα ασθένεια, που ονομάστηκε Ασθένεια X των ινδορνίθων (Turkey X Disease) (Blount, 1961). Σύντομα έγινε αντιληπτό, ότι το πρόβλημα δεν περιοριζόταν στις ινδορνίθες. Επίσης, νεαρές πάπιες και φασιανοί προσβλήθηκαν και εμφάνισαν μεγάλη θνησιμότητα. Η ενδελεχής έρευνα των περιστατικών έδειξε ότι όλα σχετίζονταν με την τροφή, και συγκεκριμένα με αραχίδα προέλευσης Βραζιλίας. Το εν λόγω σιτηρέσιο αποδείχτηκε εξαιρετικά τοξικό σε πουλικά και πάπιες, προκαλώντας συμπτώματα τυπικά της ασθένειας X. Η ανάλυση αυτής της ζωοτροφής με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography-TLC), αποκάλυψε μια σειρά φθοριζόντων ουσιών, που ήταν υπεύθυνες για τα θανατηφόρα περιστατικά, και οι οποίες αναγνωρίστηκαν ως τοξίνες μυκητιακής προέλευσης (Sargeant και συν., 1961). Το 1962 ο τοξινογόνος μύκητας ταυτοποιήθηκε ως ο *Aspergillus flavus*, και στην παραγόμενη τοξίνη δόθηκε το όνομα αφλατοξίνη (Sargeant και συν., 1963· Rustom, 1997).

Περίπου την ίδια περίοδο, στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, παρατηρήθηκε μια σοβαρή έξαρση ηπατικού καρκίνου (ηπάτωμα) σε πέστροφες ιχθυοτροφείου, η οποία αποδόθηκε στη μόλυνση από αφλατοξίνες ενός μίγματος βαμβακόσπορου, που αποτελούσε συστατικό του σιτηρεσίου τους (Wood και Larson, 1961· Sinnhuber και συν., 1977).

Σε παγκόσμιο επίπεδο έχουν αναφερθεί διάφορα περιστατικά οξείας αφλατοξίκωσης. Η πρώτη περίπτωση παρατηρήθηκε στην Ταϊβάν, το 1967, όπου υπήρξε δηλητηρίαση 26 ατόμων, μετά από κατανάλωση μουχλιασμένου ρυζιού (Ling και συν., 1967· Park και

Liang, 1993). Μερικά χρόνια αργότερα, το 1970, στην Ουγκάντα, ένα δεκαπεντάχρονο αγόρι πέθανε, δύο ημέρες μετά την εισαγωγή του σε νοσοκομείο, ενώ στην οικία του βρέθηκε μουχλιασμένη κασάβα (ρίζα αφρικανικού φυτού, που αποτελεί τρόφιμο), που περιείχε 1700 µg/kg αφλατοξίνης (Serck-Hanssen, 1970· Park και Liang, 1993). Στην Ινδία, το 1974, παρατηρήθηκε έξαρση κρουσμάτων ηπατίτιδας σε 396 άτομα, από τα οποία τα 106 απεβίωσαν, η οποία οφειλόταν σε αφλατοξίκωση (Krishnamachari και συν., 1975· Reddy και Raghavender, 2007). Στην προκειμένη περίπτωση ενοχοποιήθηκε ο αραβόσιτος, ο οποίος βρέθηκε υπερβολικά μολυσμένος με το μύκητα *Aspergillus flavus*, που περιείχε μέχρι και 15 mg/kg αφλατοξίνης. Ορισμένοι, μάλιστα, από τους ενήλικες ασθενείς εκτιμήθηκε ότι κατανάλωσαν 2-6 mg αφλατοξίνης, μέσα σε μία μόνο ημέρα. Ένα ακόμα περιστατικό οξείας αφλατοξίκωσης παρατηρήθηκε στην Κένυα, το 1982, όπου ανάμεσα σε 20 ασθενείς που ανέπτυξαν ηπατίτιδα, οι 12 πέθαναν (Ngindu και συν., 1982). Η αφλατοξίνη B₁ ανιχνεύθηκε στο ήπαρ 2 ασθενών, σε επίπεδα 39 µg/kg και 89 µg/kg, ενώ υψηλά ήταν και τα επίπεδά της σε δείγματα καλαμποκιού από τα προσβλημένα νοικοκυριά (3200-12000 µg/kg). Σε νοικοκυριά που δεν είχαν παρατηρηθεί κρούσματα, τα επίπεδα αφλατοξίνης B₁ δεν ξεπερνούσαν τα 500 µg/kg (Park και Liang, 1993).

Επιπρόσθετα, οι αφλατοξίνες έχουν εμπλακεί και στο σύνδρομο του Reye. Πρόκειται για ένα οξύ και συχνά θανατηφόρο νόσημα, που χαρακτηρίζεται από εγκεφαλοπάθεια και λιπώδη εκφύλιση των σπλάχνων. Το σύνδρομο αυτό περιγράφηκε πρώτα μεταξύ 1951 και 1962 στην Αυστραλία από τον Reye και τους συνεργάτες του. Τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου είναι έμετοι, σπασμοί και κόμα, ενώ τα πιο σταθερά βιοχημικά του ευρήματα είναι η υπογλυκαιμία και οι αυξημένες τρανσαμινάσες στον ορό του αίματος. Τέλος, τα κύρια νεκροτομικά ευρήματα που παρατηρήθηκαν είναι η λιπώδης εκφύλιση του ήπατος και των νεφρών και το εγκεφαλικό οίδημα (Belay και συν., 1999). Οι αφλατοξίνες ενδέχεται να συμβάλλουν στην πρόκληση του συνδρόμου αυτού, καθώς σε περιστατικά στην Ταϊλάνδη (Shang και συν., 1971), στη Νέα Ζηλανδία (Becroft και Webster, 1972), στην Τσεχοσλοβακία (Dvorachova και συν., 1977), και στις Η.Π.Α. (Chaves-Carballo και συν., 1976), ανιχνεύθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B₁ σε ήπατα παιδιών που πέθαναν από το σύνδρομο του Reye.

Όσον αφορά στην υποξεία αφλατοξίκωση, υπάρχει πιθανή συσχέτιση των αφλατοξινών με την Ινδική παιδική κίρρωση. Στην Ινδία, η κίρρωση του ήπατος είναι η τρίτη πιο συχνή αιτία θανάτου στα παιδιά κάτω των 5 ετών. Με την ύπουλη εκδήλωσή της, που

περιλαμβάνει χαμηλό πυρετό και μέτρια κοιλιακή τάση, που ακολουθούνται από ηπατομεγαλία, με χαρακτηριστικά "φυλλώδη" όρια, η ασθένεια μπορεί να εξελιχθεί σε ίκτερο, ασκίτη, ίνωση, κίρρωση και ηπατικό κώμα (Amla και συν., 1971· Yadgiri και συν., 1970). Σε ένα περιστατικό, σε παιδιά που υπέφεραν από Kwarsiorakor, δόθηκε ως συμπλήρωμα άλευρο φιστικιού για αρκετές εβδομάδες, μέχρι που ανακαλύφθηκε ότι το συμπλήρωμα περιείχε 300 ppb αφλατοξίνης. Βιοψίες ήπατος που λήφθηκαν 1 με 2 μήνες μετά την κατανάλωση του τοξικού γεύματος, έδειξαν λιπώδη εκφύλιση, ενώ μετά από 4 μήνες ήταν εμφανείς, η εμφάνιση ίνωσης και κίρρωσης.

Επιπρόσθετα, το Kwarsiorakor, μια ασθένεια των παιδιών στη Βόρεια Αφρική, και γενικά σε υποσιτιζόμενους πληθυσμούς, που αποδίδεται σε διατροφικές ανεπάρκειες, ενδέχεται να συνδέεται με πρόσληψη αφλατοξίνης (Hendrickse και συν., 1982). Η προοδευτικά αυξανόμενη με την πρόσληψη αφλατοξίνης ηπατική βλάβη, μπορεί να καθιστά τα παιδιά αυτά λιγότερο ικανά να ανταπεξέλθουν στις υψηλής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης δίαιτες, που συνήθως χορηγούνται ως θεραπεία του νοσήματος αυτού (Newell, 1983).

Τέλος, πρόσφατα, στην Κένυα, το 2004, το πρόβλημα της αφλατοξίκωσης επανεμφανίστηκε, οδηγώντας τουλάχιστο 125 ανθρώπους στο θάνατο, μετά από κατανάλωση αραβόσιτου μολυσμένου με αφλατοξίνη (Assiz-Baumgartner και συν., 2005).

1.2.2 Παθογόνα αίτια

Οι αφλατοξίνες είναι μια ομάδα περίπου 20 δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων μυκήτων του γένους *Aspergillus*. Από χημικής άποψης, είναι παράγωγα διφουρανοκουμαρίνης (Buchi και Rae, 1969). Μεταξύ αυτών, οι κυριότερες είναι οι B₁, B₂, G₁, G₂, καθώς και η αφλατοξίνη M₁ (Ellis και συν., 1991). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι αφλατοξίνες παράγονται από μύκητες που ανήκουν στο γένος *Aspergillus*, και κυρίως από τα είδη *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*. Η αφλατοξίνη B₁, που αποτελεί την πιο τοξική, και η αφλατοξίνη B₂, παράγονται τόσο από τον *A. flavus*, όσο και από τον *A. parasiticus*. Οι αφλατοξίνες G₁ και G₂ παράγονται από τον *A. parasiticus* (και τον *A. nomius*) (Klich και Pitt, 1988). Ωστόσο, σε ορισμένες μελέτες έχουν ταυτοποιηθεί και κάποια στελέχη του *A. flavus* που παράγουν τις αφλατοξίνες G₁ και G₂ (Cardwell και Cotty, 2002· Geiser και συν., 2000). Οι αφλατοξίνες M₁ και M₂ σχηματίζονται στο γάλα, μετά από υδρόλυση των αφλατοξινών B₁ και B₂, αντίστοιχα, που περιέχονται στην καταναλισκόμενη τροφή (Prandini και συν., 2009). Άλλοι

μεταβολίτες της B₁ είναι η αφλατοξίνη Q₁, η B_{2a}, και η αφλατοξικόλη, ενώ μεταβολίτης της G₁ είναι η αφλατοξίνη G_{2a}.

Οι αφλατοξίνες πήραν το όνομά τους από το αρχικό γράμμα της λέξης *Aspergillus*, τα τρία πρώτα γράμματα της λέξης *flavus*, και το ουσιαστικό *toxin*, που σημαίνει τοξίνη, δηλαδή δηλητήριο (a + fla + toxin) (Ellis και συν., 1991). Χαρακτηριστική φυσικοχημική ιδιότητα των αφλατοξινών είναι ο έντονος φθορισμός των διαλυμάτων τους υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας ($\lambda_{\max} = 365 \text{ nm}$). Από το χρώμα του φθορισμού τους προκύπτει και το γράμμα που χαρακτηρίζει τις αφλατοξίνες B και G. Οι αφλατοξίνες B (B₁, B₂, B_{2a}) χαρακτηρίζονται από γαλάζιο φθορισμό ($\lambda_{\max} = 425 \text{ nm}$), και ονομάστηκαν B από το αρχικό γράμμα της λέξης Blue (γαλάζιο), ενώ οι αφλατοξίνες G (G₁, G₂, G_{2a}) χαρακτηρίζονται από πράσινο φθορισμό ($\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$), και ονομάστηκαν G από το αρχικό γράμμα της λέξης Green (πράσινο) (Wogan, 1966). Οι δείκτες 1 και 2 αναφέρονται στα πρότυπα διαχωρισμού των ουσιών αυτών με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC - Thin Layer Chromatography) (Bullerman, 1979· Stroka και Anklam, 2000). Συνομογραφικά, οι αφλατοξίνες συμβολίζονται ως : AFB₁, AFB₂, AFB_{2a}, AFG₁, AFG₂, AFG_{2a}, AFM₁, AFM₂.

Στον πίνακα 1.2 αναγράφονται συνοπτικά οι πηγές και οι ιδιότητες των κυριότερων αφλατοξινών.

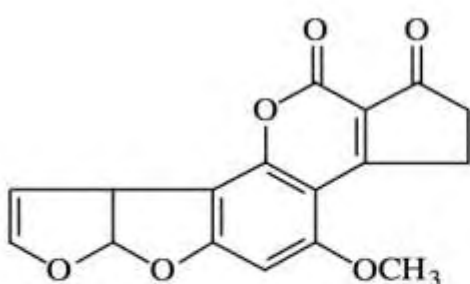
Πίνακας 1.2. Πηγές και ιδιότητες των κυριότερων αφλατοξινών (Μαρκάκη και συν., 2007)

Αφλατοξίνη	Πηγές και ιδιότητες
B₁	Παράγεται από τον <i>A. flavus</i> και τον <i>A. parasiticus</i> . Κυανός φθορισμός (425 nm). Θεωρείται ως η ισχυρότερη καρκινογόνος ουσία για το ήπαρ.
B₂	Παράγεται από τον <i>A. flavus</i> και τον <i>A. parasiticus</i> . Κυανός φθορισμός (425 nm).
G₁	Παράγεται από τον <i>A. parasiticus</i> . Πράσινος φθορισμός (450 nm).
G₂	Παράγεται από τον <i>A. parasiticus</i> . Πράσινος φθορισμός (450 nm).
M₁	Μεταβολίτης της B ₁ στους ανθρώπους και τα ζώα. Βρίσκεται στο μητρικό γάλα σε ποσότητες ng.
M₂	Μεταβολίτης της B ₂ στους ανθρώπους και τα ζώα. Βρίσκεται στο γάλα (και σε γαλακτοκομικά προϊόντα) βοοειδών που τρέφονται με τροφές μολυσμένες με B ₂ .

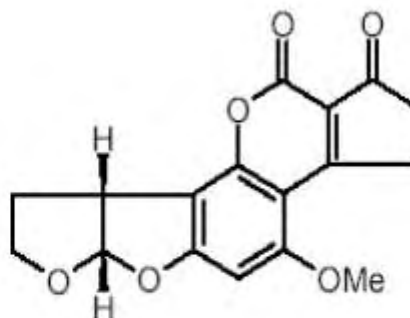
B_{2a}	Προϊόν προσθήκης ύδατος (καταλυόμενη από οξέα) στη B ₁ . Κυανός φθορισμός (425 nm).
G_{2a}	Προϊόν προσθήκης ύδατος (καταλυόμενη από οξέα) στη G ₁ . Πράσινος φθορισμός (450 nm).

1.2.3 Φυσικές - Χημικές ιδιότητες αφλατοξινών

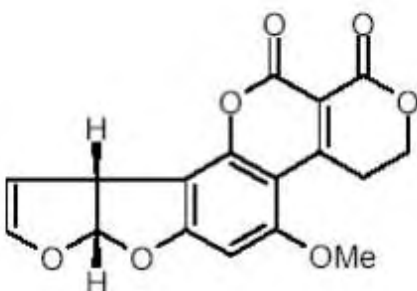
Το 1963, οι Asao και συν., προσδιόρισαν το χημικό και φυσικό χαρακτήρα των αφλατοξινών B₁, B₂, G₁, και G₂. Από χημικής άποψης, όπως άλλωστε ήδη έχει αναφερθεί, οι αφλατοξίνες είναι διφουρο-κουμαρολακτόνες (παράγωγα διφουρο-κουμαρίνης). Η δομή τους αποτελείται από ένα διύδρο διφουρανικό τμήμα που συνδέεται με ένα πυρήνα κουμαρίνης. Από την άλλη μεριά του πυρήνα η δομή συμπληρώνεται είτε με κυκλοπεντανόνη (αφλατοξίνες B και M) είτε με δ-λακτόνη (αφλατοξίνες G) (Εικόνα 1.3).



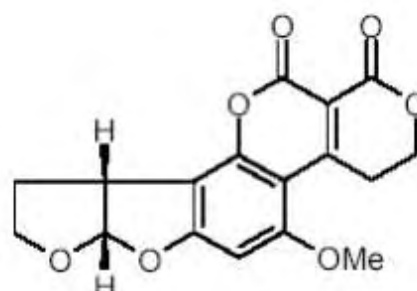
AFB₁



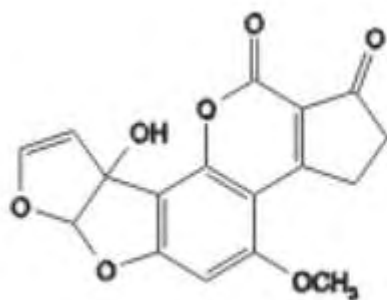
AFB₂



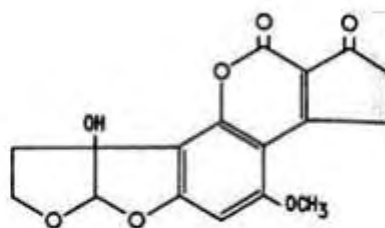
AFG₁



AFG₂



AFM₁



AFM₂

Εικόνα 1.3. Χημικοί τύποι αφλατοξινών B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂

1.2.3.1 Φυσικές ιδιότητες

Ο μοριακός τύπος της αφλατοξίνης B₁ είναι C₁₇H₁₂O₆, και της G₁, C₁₇H₁₂O₇. Οι αφλατοξίνες B₂ και G₂ βρέθηκε ότι αποτελούν διυδρο-παράγωγα των B₁ και G₁, με μοριακούς τύπους C₁₇H₁₄O₆ και C₁₇H₁₄O₇, αντίστοιχα (Hartley και συν., 1963). Όσον αφορά στα προϊόντα υδρόλυσης των αφλατοξινών B₁ και B₂, τις αφλατοξίνες M₁ και M₂, οι μοριακοί τους τύποι είναι C₁₇H₁₂O₇ και C₁₇H₁₄O₇, αντίστοιχα.

Πρόκειται για άχρωμες έως υποκίτρινες κρυσταλλικές ουσίες, άοσμες και φωτοευαίσθητες. Ο έντονος φθορισμός τους με την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας έχει ήδη σχολιαστεί, ενώ πληροφορίες για τα σημεία τήξης τους και τη φασματοσκοπία απορρόφησης, δίνονται στον πίνακα 1.3.

°

Πίνακας 1.3. Φυσικές ιδιότητες αφλατοξινών (IARC, 2002· Reddy και Waliyar, 2000)

Αφλατοξίνη	M.B.	Σημείο τήξης (°C)	Απορρόφηση στο υπεριώδες (αιθανόλη)	
			$\lambda_{\max}(\text{nm})$	$\epsilon (\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1})$
B₁ (C ₁₇ H ₁₂ O ₆)	312,28	268-269 (αποσύνθεση) (κρύσταλλοι από χλωροφόρμιο)	223	25 600
			265	13 400
			362	21 800
B₂ (C ₁₇ H ₁₄ O ₆)	314,29	286-289 (αποσύνθεση) (κρύσταλλοι από χλωροφόρμιο-πεντάνιο)	265	11 700
			363	23 400
G₁ (C ₁₇ H ₁₂ O ₇)	328,28	244-246 (αποσύνθεση) (κρύσταλλοι από χλωροφόρμιο-μεθάνιο)	243	11 500
			257	9 900
			264	10 000
			362	16 100
G₂ (C ₁₇ H ₁₄ O ₇)	330,29	237-240 (αποσύνθεση) (κρύσταλλοι από οξικό αιθυλεστέρα)	265	9 700
			363	21 000
M₁ (C ₁₇ H ₁₂ O ₇)	328,28	299 (αποσύνθεση) (κρύσταλλοι από μεθανόλη)	226	23 100
			265	11 600
			357	19 000
M₂ (C ₁₇ H ₁₄ O ₇)	330,29	293 (αποσύνθεση) (κρύσταλλοι από μεθανόλη)	264	12 100
			357	22 900

1.2.3.2 Χημικές ιδιότητες

Οι αφλατοξίνες ανήκουν στις μέτριας πολικότητας χημικές ενώσεις με $\log P \sim 2$ (ChEMBL Database), πολύ λίγο διαλυτές στο νερό (10-30 $\mu\text{g/mL}$), διαλυτές όμως σε οργανικούς διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο, τη μεθανόλη, την ακετόνη, το ακετονιτρίλιο και το διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO) (Cole και Cox, 1981).

Οι χημικές ιδιότητες των αφλατοξινών έχουν αποτελέσει αντικείμενο λίγων συστηματικών μελετών, σε σχέση με εκείνες που έχουν ασχοληθεί με τη δομή των ουσιών αυτών. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί (Asao και συν., 1963), ότι η καταλυτική υδρογόνωση της αφλατοξίνης B₁ - όταν ολοκληρωθεί - έχει ως αποτέλεσμα την πρόσκτηση 3 μορίων υδρογόνου, και την παραγωγή ενός τετραϋδρο-δεοξυ-παραγώγου.

Διακοπή της υδρογόνωσης, μετά την πρόσκτηση 1 μορίου υδρογόνου, καταλήγει στην παραγωγή της αφλατοξίνης B₂. Οι αντιδράσεις των αφλατοξινών σε διάφορες φυσικές συνθήκες έχουν μελετηθεί εκτενώς, λόγω της ενδεχόμενης εφαρμογής τους στην αποτοξίνωση φυτών και των τροφίμων.

Θερμότητα

Οι αφλατοξίνες σε ξηρή κατάσταση είναι πολύ σταθερές για να ζεσταθεί το σημείο τήξης. Ωστόσο, παρουσία υγρασίας και σε υψηλές θερμοκρασίες οι αφλατοξίνες καταστρέφονται. Παρά το γεγονός ότι τα προϊόντα της αντίδρασης δεν έχουν εξεταστεί λεπτομερώς, φαίνεται πιθανό ότι η θερμότητα οδηγεί στο άνοιγμα του δακτυλίου της λακτόνης με δυνατότητα αποκαρβοξυλίωσης σε υψηλές θερμοκρασίες.

Αλκάλια

Σε αλκαλικό διάλυμα το μόριο της λακτόνης υδρολύεται, γεγονός το οποίο μπορεί να αναστραφεί. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες (περίπου 100°C) η διάνοιξη του δακτυλίου που ακολουθείται από αποκαρβοξυλίωση, προχωράει περαιτέρω, με αποτέλεσμα την απώλεια της μεθοξυ-ομάδας από τον αρωματικό δακτύλιο. Παρόμοια σειρά αντιδράσεων λαμβάνει χώρα με την αμμωνία, καθώς και διάφορες αμίνες.

Οξέα

Παρουσία ανόργανων οξέων, οι αφλατοξίνες B₁ και G₁ μετατρέπονται στις αφλατοξίνες B_{2a} και G_{2a}, λόγω της καταλυόμενης από οξέα προσθήκης νερού στον διπλό δεσμό του δακτυλίου φουρανίου. Παρουσία οξικού ανυδρίτη και υδροχλωρικού οξέος η αντίδραση συνεχίζεται και δίνει ένα ακετοξικό παράγωγο. Η επεξεργασία με μυρμηκικό οξύ - χλωριούχο θειονύλιο, οξικό οξύ - χλωριούχο θειονύλιο, ή τριφθοροξικό οξύ, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων με σημαντικές αλλαγές στις χρωματογραφικές τους ιδιότητες, αλλά σχετικά αμετάβλητα χαρακτηριστικά φθορισμού οξέος.

Οξειδωτικοί παράγοντες

Πολλοί οξειδωτικοί παράγοντες, όπως το υποχλωριώδες νάτριο, το υπερμαγγανικό κάλιο, το χλώριο, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το όζον και το υπερβορικό νάτριο αντιδρούν με τις αφλατοξίνες και μεταβάλλουν το μόριο τους, όπως προκύπτει από την απώλεια του φθορισμού. Οι μηχανισμοί αυτών των αντιδράσεων δεν έχουν αποσαφηνιστεί και τα προϊόντα αντίδρασης παραμένουν άγνωστα στις περισσότερες

περιπτώσεις.

Αναγωγή

Η υδρογόνωση των αφλατοξινών B_1 και G_1 αποδίδει τις αφλατοξίνες B_2 και G_2 , αντίστοιχα. Η περαιτέρω αναγωγή της αφλατοξίνης B_1 από 3 μόρια υδρογόνου αποδίδει την τετραϋδροαφλατοξίνη. Η αναγωγή των αφλατοξινών B_1 και B_2 με βοροϋδρίδιο του νατρίου αποδίδει τις αφλατοξίνες RB_1 και RB_2 αντίστοιχα. Οι αντιδράσεις αυτές είναι το αποτέλεσμα του ανοίγματος του δακτυλίου της λακτόνης που ακολουθείται από αναγωγή της οξικής ομάδας, καθώς και αναγωγή της κετονομάδας στο δακτύλιο του κυκλοπεντενίου.

Η οξονόλυση οδηγεί σε κατακερματισμό της αφλατοξίνης B_1 , και τα παράγωγα της αντίδρασης αυτής περιλαμβάνουν λεβουλινικό, ηλεκτρικό, μηλονικό, και γλουταρικό οξύ (Van Dorp και συν., 1963). Ακόμα, η παρουσία του δακτυλίου λακτόνης καθιστά την αφλατοξίνη B_1 ασταθή στην αλκαλική υδρόλυση, ενώ έχει αναφερθεί μερική επανακυκλοποίηση, ύστερα από οξύνιση του υδρολυθέντος προϊόντος (De Iongh και συν., 1962).

Παρόλο που λίγες συστηματικές μελέτες έχουν διενεργηθεί σχετικά με τη σταθερότητα των αφλατοξινών, υπάρχουν παραδείγματα υποβάθμισής τους, κάτω από διάφορες συνθήκες, καθώς είναι ασταθείς στο υπεριώδες φως, παρουσία οξυγόνου, σε ακραίες τιμές pH (< 3 , > 10), και σε οξειδωτικούς παράγοντες (IARC, 2002). Έτσι, εμφανίζουν μερική αποσύνθεση κατά την παραμονή τους σε διάλυμα μεθανόλης, διαδικασία που επιταχύνεται από την παρουσία φωτός ή θερμότητας. Σημαντική αποδόμηση συμβαίνει επίσης σε χρωματογραφήματα αφλατοξινών, που εκτίθενται στον αέρα (οξυγόνο) και σε υπεριώδες ή ορατό φως. Οι διαδικασίες αυτές ενδέχεται να δημιουργούν κάποιες από τις μη αφλατοξινογόνες φθορίζουσες ουσίες, που παρατηρούνται στα χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων από καλλιέργειες.

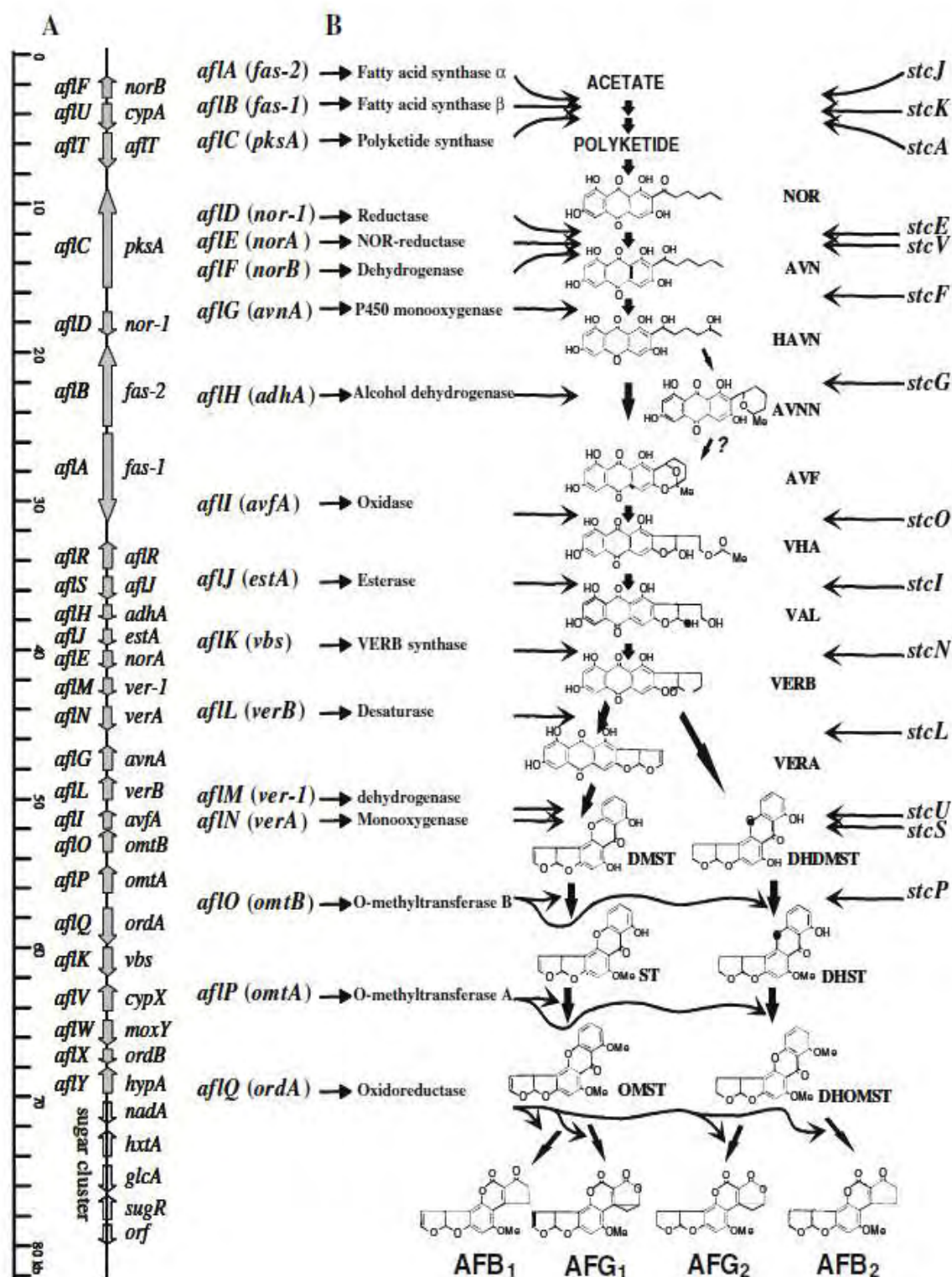
1.2.4 Βιοσύνθεση αφλατοξινών

1.2.4.1 Γενετική της βιοσύνθεσης αφλατοξινών

Προηγούμενες μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι αφλατοξίνες συνθέτονται από ένα πολυκετιδικό μεταβολικό μονοπάτι (Bhatnagar και συν., 2003· Yu και συν., 2004). Η χαρτογράφηση του γενετικού υλικού των *A. parasiticus* και *A. flavus*, απέδειξε ότι τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των αφλατοξινών είναι ομαδοποιημένα (Trail και συν., 1995). Γενικά, το σύμπλεγμα γονιδίων σύνθεσης αφλατοξίνης στους *A.*

parasiticus και *A. flavus*, αποτελείται από 25 γονίδια, με μήκος περίπου 70 kb (kilo-base pair : μονάδα μέτρησης του μήκους του DNA ή του RNA, που ισοδυναμεί με 1000 νουκλεοτίδια) (Εικόνα 1.4) (Yu και συν., 2002). Ένα θετικό ρυθμιστικό γονίδιο, το *aflR*, που κωδικοποιεί μια ειδική για την αλληλουχία πρωτεΐνη, ανήκει στο σύμπλεγμα αυτό, και είναι απαραίτητο για τη μεταγραφική ενεργοποίηση των περισσότερων γονιδίων που ελέγχουν τη δόμηση της αφλατοξίνης (Bhatnagar και συν., 2003). Γειτονικό και με διαφορές στη μεταγραφή του, σε σχέση με το γονίδιο *aflR*, είναι το *aflJ*. Το *aflJ* δεν έχει επιδείξει σημαντική ομολογία με κανένα άλλο γονίδιο/πρωτεΐνη που υπάρχει στις βάσεις δεδομένων. Παρ' όλο που η ακριβής λειτουργία του *aflJ* δεν είναι ξεκάθαρη σήμερα, φαίνεται ότι είναι αναγκαίο για την έκφραση άλλων γονιδίων στο "σύμπλεγμα" της αφλατοξίνης (Meyers και συν., 1998· Chang, 2003). Η λειτουργία των περισσότερων γονιδιακών προϊόντων στη σύνθεση της αφλατοξίνης, συνάγεται είτε με γενετικά, είτε με βιοχημικά μέσα (Yabe και Nakajima, 2004). Από τα 25 γονίδια που έχουν ταυτοποιηθεί στο μονοπάτι σύνθεσης αφλατοξίνης, μόνο σε 4 (*norA*, *norB*, *aflT*, και *ordB*) δεν έχει προσδιοριστεί πειραματικά η λειτουργία των πρωτεϊνικών τους προϊόντων.

Η στεριγματοκυστίνη είναι μια πρόδρομος ουσία αφλατοξίνης. Σε μερικούς μύκητες που είναι μακρινοί συγγενείς των *A. flavus* και *A. parasiticus*, η στεριγματοκυστίνη είναι ο τελικός μεταβολίτης. Τα βιοσυνθετικά και ρυθμιστικά γονίδια που απαιτούνται για την παραγωγή στεριγματοκυστίνης στον *A. nidulans*, είναι ομόλογα με εκείνα που απαιτούνται για την παραγωγή αφλατοξίνης στους *A. flavus* και *A. parasiticus*, και είναι επίσης ομαδοποιημένα (Yu και συν., 2004· Brown και συν., 1996). Ωστόσο, η οργάνωση των γονιδίων στο "σύμπλεγμα" του *A. nidulans*, είναι κάπως διαφορετική από την αντίστοιχη των *A. flavus* και *A. parasiticus*. Η ταύτιση αλληλουχιών των ομαδοποιημένων γονιδίων μεταξύ των *A. flavus* και *A. parasiticus* είναι περίπου 90-99%, ενώ μεταξύ των *A. parasiticus* και *A. nidulans*, 55-75% (Yu και συν., 2004).



Εικόνα 1.4. Καθολικά αποδεκτό μονοπάτι για τη βιοσύνθεση αφλατοξίνης και στεριγματοκυστίνης (Yu και συν., 2002)

1.2.4.2 Μεταγραφικοί κανόνες της σύνθεσης αφλατοξίνης

Τα πιο πολλά από τα 25 γονίδια στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των αφλατοξινών, ρυθμίζονται από την πρωτεΐνη *AflR*, μία πρωτεΐνη Gal4-τύπου (Bhatnagar και συν., 2003). Η πρωτεΐνη αυτή δεσμεύεται στο παλίνδρομο μοτίβο 5'-TCGN₅CGA-3', στον υποκινητή των δομικών γονιδίων για την αφλατοξίνη. Οι περιοχές υποκίνησης της πλειοψηφίας των γονιδίων βιοσύνθεσης αφλατοξίνης διαθέτουν τουλάχιστο μία 5'-TCGN₅CGA-3' τοποθεσία δέσμευσης, ανάμεσα σε 200 bp (base pair – ζεύγη βάσεων) της εναρκτήριας για τη μετάφραση περιοχής, παρόλο που κάποιες υποθετικές τοποθεσίες δέσμευσης έχουν αναγνωρισθεί, με κατεύθυνση το 5'- άκρο της αλυσίδας του DNA (Yu και συν., 2004). Με βάση τη σύγκριση 16 πιθανών περιοχών, η κοινή αλληλουχία δέσμευσης ήταν η 5'-TCGSWVNSCGR-3' (Ehrlich και συν., 1999). Κατ' αναλογία με τις περισσότερες πρωτεΐνες Gal4-τύπου που δεσμεύονται σε μερικώς παλίνδρομα τμήματα του γενετικού υλικού, η *AflR* πιθανά δεσμεύεται στη θέση αναγνώρισής της, ως διμερές. Το γονίδιο, *aflR*, μπορεί να αυτορυθμίζεται, καθώς και να βρίσκεται κάτω από την επίδραση ανασταλτικών ρυθμιστών. Στοιχεία που βρίσκονται προς το 5'- άκρο της αλυσίδας του DNA, ενδέχεται να εμπλέκονται στην ανασταλτική ρύθμιση της υποκινητικής δραστηριότητας του *aflR* (Chang και συν., 1999).

Ένας αριθμός μελετών έχουν καταλήξει σε μια γενετική σύνδεση ανάμεσα στη βιοσύνθεση αφλατοξίνης/στεριγματοκυστίνης και στην ανάπτυξη του μύκητα. Μεταλλαγμένα στελέχη του *Aspergillus* χρησιμοποιήθηκαν για να φωτίσουν μερικώς το μονοπάτι "σινιάλων", που συνδέει το δευτερογενή μεταβολισμό των μυκήτων με την ανάπτυξή τους. Η πρώιμη δουλειά των Kale και συν. (2003), αναγνώρισε ότι μεταλλαγμένοι *Aspergillus*, ελαττωματικοί όσον αφορά στη δημιουργία κονιδίων, συχνά έχαναν την ικανότητα να παράγουν αφλατοξίνη. Η μελέτη αυτή επεκτάθηκε, αναλύοντας μια σειρά σημάτων με τη μεσολάβηση G-πρωτεϊνών στον *A. nidulans*, που ρυθμίζει τόσο την αγενή σπορογένεση, όσο και την παραγωγή στεριγματοκυστίνης, και τους ρόλους του cAMP (κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη) και της πρωτεϊνικής κινάσης A, στις δύο διαδικασίες (Hicks και συν., 1997). Ένα πιθανό ρυθμιστικό γονίδιο για τη μεταγραφή, το *veA*, που έχει εντοπιστεί στους *A. nidulans* και *A. parasiticus*, ελέγχει τόσο την παραγωγή τοξίνης, όσο και τη σεξουαλική εξέλιξη (Kato και συν., 2003). Μύκητες *A. nidulans* και *A. parasiticus* με μεταλλαγμένο το γονίδιο *veA*, δεν είναι ικανοί να παράγουν στεριγματοκυστίνη ή αφλατοξίνη. Επιπρόσθετα, οι *A. nidulans* και *A. parasiticus*, δεν παράγουν ασκοκάρπια (φυλετικά διαφοροποιημένες πολυκυτταρικές δομές, από τις οποίες προέρχονται τα ασκοσπόρια), και σκληρώτια (μη

φυλετικά διαφοροποιημένοι ανθεκτικοί σχηματισμοί διαχείμανσης), αντίστοιχα. Καμιά σημαντική ταύτιση αλληλουχιών δεν έχει παρατηρηθεί ανάμεσα στο *veA* και σε άλλα γονίδια που υπάρχουν στις βάσεις δεδομένων. Τέλος, ένας αριθμός γενετικών τοποθεσιών αναγνωρίστηκαν σε μεταλλαγμένα στελέχη *A. nidulans*, και είχαν ως αποτέλεσμα την απώλεια της ικανότητας για παραγωγή στεριγματοκυστίνης, χωρίς να επηρεάσουν τις διαδικασίες ανάπτυξης (Butchko και συν., 1999). Συμπληρωματικές μελέτες με ένα από τα μεταλλαγμένα αυτά στελέχη, επισήμαναν ένα γονίδιο, το *laeA*, που κωδικοποιεί ένα ένζυμο με παρόμοια αλληλουχία με τις μεθυλ-τρανσφεράσες, και φαίνεται να απαιτείται για την έκφραση της στεριγματοκυστίνης. Ομόλογα του *laeA*, έχουν βρεθεί σε αρκετούς νηματοειδείς μύκητες. Σε όλα τα είδη που έχουν εξεταστεί, η αποδιοργάνωση του *laeA* οδήγησε στην απώλεια της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών, ενώ η υπερβολική έκφρασή του οδήγησε σε υπερπαραγωγή τους (Bok και Keller, 2004).

Η θέση τους στο χρωμόσωμα επίσης επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων της "ομάδας" της αφλατοξίνης (Chiou και συν., 2002). Παλαιότερες μελέτες έδειξαν ότι επιγενετικοί κυρίως παράγοντες είναι που επηρεάζουν τις αναγκαίες για το μύκητα εξελικτικές μεταβολές έτσι, ώστε να μπορεί να μεταπηδά, από τη συνήθη αναπτυξιακή του πορεία (πρωτογενής μεταβολισμός), στο δευτερογενή μεταβολισμό (παραγωγή αφλατοξίνης) και τα κύτταρα αναπαραγωγής (κονίδια και σκληρώτια) (Calvo και συν., 2004). Η υπο-τελομερής εντόπιση της ομάδας γονιδίων της αφλατοξίνης στο χρωμόσωμα 3, μπορεί να επηρεάσει την προσβασιμότητα των γονιδίων αυτών σε μεταγραφικούς παράγοντες. Η θέση τους στο χρωμόσωμα έχει αποδειχτεί ότι επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων αφλατοξίνης (Chiou και συν., 2002). Στοιχεία που συνορεύουν με τα τελομερή του DNA, διαχωρίζουν τις ενεργές από τις μη ενεργές περιοχές χρωματίνης, και σταματούν τη διάδοση της μη ενεργού. Επιπρόσθετα, καθολικά δρώντες μεταγραφικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που μεσολαβούν στη ρύθμιση αζώτου, άνθρακα και pH, επηρεάζουν την οργάνωση της χρωματίνης κοντά στο σημείο έναρξης της μεταγραφής (Gomez και συν., 2003). Πιο άμεσα, δρουν και ως παράγοντες που ενεργοποιούν ή αναστέλλουν τη μεταγραφή, δεσμευόμενοι σε ειδικές περιοχές της αλληλουχίας του υποκινητή, και, είτε δημιουργώντας σύμπλοκα με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, είτε παρεμποδίζοντας τη δέσμευση παραγόντων που προωθούν τη μεταγραφή (Arst και Penalva, 2003).

2. ΟΙ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ ΣΤΑ ΦΥΤΑ

Το γένος *Aspergillus* αποτελεί μια μεγάλη οικογένεια μυκήτων, που καταλαμβάνουν ποικίλες οικολογικές θέσεις. Παρόλο που τα "μέλη" του γένους αυτού έχουν παγκόσμια κατανομή, εμφανίζονται άφθονα σε γεωγραφικά πλάτη μεταξύ 26° και 35° βόρεια ή νότια του ισημερινού (Klich και συν., 1992). Έτσι, οι μύκητες αυτοί είναι περισσότερο κοινοί σε υποτροπικά και ζεστά, εύκρατα κλίματα. Γενικότερα θεωρούμενα ως σαπρόφυτα, τα είδη του γένους *Aspergillus* αναπτύσσονται σε ένα μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων, και είναι πολύ σημαντικά στην ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων. Η ικανότητά τους να "ευημερούν" σε υψηλές θερμοκρασίες και με σχετικά χαμηλή ενεργότητα νερού, τα καθιστά ικανά να αποικίζουν έναν αξιοσημείωτο αριθμό σιτηρών και καλλιεργειών ξηρών καρπών. Κάτω από ευνοϊκές συνθήκες, μερικά είδη εμφανίζουν περιορισμένες παρασιτικές ικανότητες, και μπορούν να αποικίσουν καλλιέργειες στον αγρό.

Οι μύκητες *A. flavus* και *A. parasiticus* έχουν επικαλυπτόμενες οικολογικές θέσεις, και μπορούν να παράγουν αφλατοξίνες σε καρπούς αραβόσιτου, αράπικου φιστικιού, βαμβακιού, ρυζιού, αμύγδαλου, και φιστικιού Αιγίνης. Και άλλοι ξηροί καρποί, όπως τα καρύδια και τα φιστίκια Βραζιλίας, προσβάλλονται. Επίσης, τα σύκα μολύνονται, αλλά η επίπτωση είναι μικρή. Επιπρόσθετα, οι μύκητες αυτοί είναι ικανοί να παράγουν αφλατοξίνες σε όλα σχεδόν τα προϊόντα που δεν αποθηκεύονται σωστά. Ο *Aspergillus flavus* είναι το κυρίαρχο είδος σε όλα τα προϊόντα που μολύνονται με αφλατοξίνες (Payne, 1992· 1998), παρόλο που ο *A. parasiticus* είναι περισσότερο κοινός στο αράπικο φιστίκι (Horn και συν., 1994). Τα δύο αυτά είδη είναι παρόμοια, οπότε ο *A. flavus* χρησιμοποιείται για την αναφορά και στο είδος *A. parasiticus*.

Ο *A. flavus* αναφέρθηκε ως αιτιολογικός παράγοντας της μούχλας στο καλαμπόκι από το 1920 (Taubenhaus, 1920), αλλά στο μύκητα δε δόθηκε ιδιαίτερη σημασία μέχρι τη δεκαετία του 1960, όταν αποδείχτηκε - όπως άλλωστε έχει ήδη αναφερθεί - ότι παρήγαγε τον παράγοντα (που αργότερα ταυτοποιήθηκε ως αφλατοξίνη) που συνδέεται με την ασθένεια Χ των ινδορνίθων. Η σημασία της μόλυνσης του καλαμποκιού πριν τη συγκομιδή, από τον *A. flavus* (Butler, 1947· Eddins, 1930), είχε υποτιμηθεί πριν το 1971, καθώς οι αφλατοξίνες θεωρούνταν πρόβλημα που αντιμετωπίζουν μόνο οι αποθηκευμένες τροφές. Η αναφορά μόλυνσης με αφλατοξίνες σε νότιες και κεντρο-δυτικές περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών, στη δεκαετία του 1970 (Anderson και συν., 1975· Lillehoj και συν., 1975· Widstrom, 1996), αφύπνισε την παγκόσμια ερευνητική

κοινότητα, όσον αφορά στη σημαντικότητα της μόλυνσης με αφλατοξίνες πριν τη συγκομιδή.

Τα περιστατικά μόλυνσης με αφλατοξίνες είναι σποραδικά, και άμεσα εξαρτημένα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Μεγάλοι πληθυσμοί μυκήτων *A. flavus* και μόλυνση με αφλατοξίνες, λαμβάνουν χώρα κάθε χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες, αλλά σοβαρές εξάρσεις συνδέονται με θερμοκρασία πάνω από το μέσο όρο, που συνοδεύεται με βροχοπτώσεις κάτω από το μέσο όρο των βροχοπτώσεων για τη συγκεκριμένη εποχή (Widstrom, 1996). Οι δύο αυτές περιβαλλοντικές συνθήκες συνδέθηκαν με υψηλής συχνότητας μόλυνση με αφλατοξίνες στις κεντρο-δυτικές περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών - όπου η καλλιέργεια καλαμποκιού είναι η κυρίαρχη καλλιέργεια -, το 1983 και το 1988 (Hurburgh, 1991). Υψηλής συχνότητας μόλυνση αναφέρθηκε επίσης στη νότια Κίνα, τη νοτιο-ανατολική Ασία, και στην Αφρική (Hall και Wild, 1994).

Η διαδικασία της μόλυνσης από το μύκητα *A. flavus* έχει περιγραφεί διεξοδικά στο καλαμπόκι (Payne, 1992· 1998). Ο *Aspergillus flavus* είναι μύκητας που ζει στο έδαφος, και αναπαράγεται με μη φυλετικά διαφοροποιημένα κονίδια. Τα κονίδια που μεταφέρονται με τον αέρα ή τα έντομα στις "μεταξωτές υφές" του καλαμποκιού, μπορούν να εξελιχθούν κάτω από τα προστατευτικά φύλλα, σύντομα μετά τη γονιμοποίηση, και να αποικίσουν την επιφάνεια των σπόρων (Widstrom, 1996). Όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι ευνοϊκές, ο μύκητας μπορεί να εισβάλλει άμεσα στους σπόρους και τα στελέχη γύρω από τα οποία οι σπόροι αναπτύσσονται, ή μπορεί να εισέλθει μέσω τραυμάτων που προκαλούν τα έντομα. Σε κάθε περίπτωση, αξιοσημείωτη μόλυνση από μύκητες και επιβάρυνση του προϊόντος με αφλατοξίνες δε λαμβάνει χώρα, μέχρι η υγρασία των σπόρων να πέσει κάτω από 32% (Payne, 1998). Οι αφλατοξίνες συνεχίζουν να παράγονται στους σπόρους, μέχρι η υγρασία των τελευταίων αγγίζει το 15% (Payne και συν., 1988a). Παρόλο που τα έντομα δεν απαιτούνται για τη μόλυνση με αφλατοξίνες, η παρουσία τους αυξάνει το επίπεδο μόλυνσης. Υψηλά επίπεδα αφλατοξινών συνδέονται, σχεδόν πάντα, με τραυματισμούς από έντομα, ειδικά από τον ευρωπαϊκό σκόληκα του αραβόσιτου, *Ostrinia nubilalis* (Widstrom, 1996).

Υπάρχουν στοιχεία ότι το άνθος του αράπικου φιστικιού επίσης μπορεί να μολυνθεί από το μύκητα *A. flavus* (Griffin και Garren, 1974a), παρόλο που η συγκεκριμένη οδός μόλυνσης είναι ασήμαντη, συγκρινόμενη με τη μόλυνση του περικαρπίου (περίβλημα καρπού) (Cole και συν., 1986). Η ακριβής πορεία της μόλυνσης εντός του περικαρπίου δεν είναι γνωστή, αλλά τα έντομα φαίνεται να διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο. Τόσο τα ακάρεα, όσο και οι προνύμφες του μικρότερου "τρυπητή" του στελέχους (Lesser stalk

borer-*Elasmopalpus lignosellus*), είναι γνωστοί φορείς του μύκητα. Ακόμα και μικροσκοπική ζημιά του περικαρπίου, οδηγεί σε αύξηση της μόλυνσης από τον *A. flavus* (Lynch και Wilson, 1991).

Παρόλο που υπάρχουν δεδομένα για άμεση μόλυνση του βαμβακιού από τον *A. flavus* (Klich και Chmielewski, 1985· Klich και συν., 1984), πάντα είναι καθοριστική η συμβολή των εντόμων στα υψηλά επίπεδα αφλατοξινών στον αγρό. Οι οπές εξόδου των προνυμφών του ροζ σκώληκα της κάψας του βαμβακιού (Pink bollworm-*Pectinophora gossypiella*) φαίνεται ότι αποτελούν τις πύλες εισόδου του μύκητα (Ashworth και συν., 1971).

Η μόλυνση του φιστικιού Αιγίνης με τον *A. flavus* συνδέεται με την "πρόωρη διαίρεση", μια κατάσταση κατά την οποία το κέλυφος ανοίγει πριν ωριμάσει ο καρπός (Doster και Michailides, 1994a· 1994b). Τόσο στα φιστίκια Αιγίνης, όσο και στα αμύγδαλα, η υψηλή μόλυνση με αφλατοξίνες σχετίζεται με τραυματισμούς από την προνύμφη του πορτοκαλόχρωμου σκώληκα (Navel orange worm-*Amyelois transitella*) (Doster και Michailides, 1994a, 1994b· Thomson και Mehdy, 1978).

Οι δύο κυρίαρχες περιβαλλοντικές συνθήκες που επηρεάζουν τη μόλυνση με αφλατοξίνες, είναι η θερμοκρασία και η υγρασία (Widstrom, 1996). Στο καλαμπόκι και στο αράπικο φιστίκι, οι υψηλές θερμοκρασίες και η καταπόνηση λόγω της ξηρασίας οδηγούν σε υψηλά επίπεδα μόλυνσης με αφλατοξίνες (Payne, 1998). Σε συνθήκες καλλιέργειας στον αγρό, όταν η υγρασία και η θερμοκρασία του εδάφους ήταν ελεγχόμενες, οι Cole και συν. (1995) έδειξαν ότι κανένας από τους δύο παράγοντες δεν είναι επαρκής από μόνος του. Οι ερευνητές βρήκαν ότι φιστίκια που αναπτύσσονται κάτω από παρατεταμένη ξηρασία, και σε θερμοκρασίες μικρότερες των 25°C ή μεγαλύτερες των 32°C, ήταν απαλλαγμένες από αφλατοξίνες. Ο αποικισμός από τον *A. flavus* και η μόλυνση με αφλατοξίνες, μεγιστοποιήθηκαν στους 30,5°C.

Η υψηλή θερμοκρασία και οι συνθήκες ξηρασίας αυξάνουν τον αερομεταφερόμενο ενοφθαλμισμό από το μύκητα (Jones και συν., 1981· McGee και συν., 1996). Η αυξημένη ανάπτυξη και αναπαραγωγή του μύκητα στις υψηλότερες θερμοκρασίες πιθανά συνδέεται με τη σχετικά υψηλή βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του. Ο *Aspergillus flavus* μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (12 έως 48°C), αλλά η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι οι 37°C (Klich και συν., 1994). Οι υψηλότερες θερμοκρασίες και συνθήκες ξηρασίας ενδέχεται, ακόμα, να ευνοούν τον *A. flavus* ενάντια σε άλλους μύκητες, λόγω της ικανότητάς του να αναπτύσσεται σε υποστρώματα με χαμηλή ενεργότητα νερού. Ο μύκητας αυτός μπορεί

να αναπτυχθεί σε τόσο χαμηλή ενεργότητα νερού (a_w), όσο τα -35 megapascals (MPa) (Klich και συν., 1994). Είναι ενδιαφέρον, ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για την παραγωγή αφλατοξινών είναι 25 με 30°C (Maggon και συν., 1977). Επιπλέον, η θερμοκρασία και η καταπόνηση λόγω ξηρασίας είναι πιθανό να προδιαθέτουν το φυτό σε αυξημένη μόλυνση, αλλά οι μηχανισμοί δεν έχουν αναλυθεί επαρκώς.

Η επίδραση της θερμοκρασίας στη μόλυνση με αφλατοξίνες του βαμβακόσπορου είναι περισσότερο σύνθετη και ανεπαρκώς κατανοητή (Payne, 1998). Παρόλο που τέτοιες περιπτώσεις αποτελούν σπάνια πρόβλημα στις νότιες περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών, τα προβλήματα που προκαλούν στις δυτικές περιοχές που καλλιεργούν βαμβάκι είναι σημαντικά. Οι Ashworth και συν. (1969) υποστήριξαν ότι οι υψηλές θερμοκρασίες κατά τις νυχτερινές ώρες έχουν ιδιαίτερη σημασία. Επίσης, οι υψηλές ημερήσιες και νυχτερινές θερμοκρασίες έχουν συνδεθεί με αυξημένα επίπεδα αφλατοξινών στα αμύγδαλα (Doster και Michailides, 1995).

Η κύρια πηγή ενοφθαλισμού για τον *Aspergillus flavus* είναι το έδαφος, αλλά η κυρίαρχη δομή επιβίωσής του δεν είναι γνωστή. Ο μύκητας παράγει σκληρώτια σε καλλιέργειες και σε αγρούς καλαμποκιού στις νότιες Ηνωμένες Πολιτείες (Wicklow και συν., 1984· Zummo και Scott, 1990). Ωστόσο, δεν έχουν αναφερθεί σκληρώτια στα κεντρο-δυτικά, όπου πιθανά ο *A. flavus* επιβιώνει ως μυκήλιο, και, σε κάποιο βαθμό, ως κονίδια και σκληρώτια (Payne, 1998). Η θερμοκρασία του εδάφους (McGee και συν., 1996) και η υγρασία (Jones και συν., 1981), επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τον αριθμό των κονιδίων στο έδαφος (χώμα) και στον αέρα.

Γενικά, το έδαφος αποτελεί σημαντικό παράγοντα που επιδρά στη μόλυνση με αφλατοξίνες, καθώς τα προϊόντα που έχουν προηγούμενα καλλιεργηθεί σε αυτό, επηρεάζουν την ποσότητα και τα είδη των φυτικών απορριμμάτων στο βάθος και στην επιφάνειά του, και - κατά συνέπεια - τη διαθέσιμη μυκητιακή χλωρίδα και το μικροπεριβάλλον για την ανάπτυξη των μυκήτων (Martyniuk και Wagner, 1978). Επίσης, μεγάλη επίδραση στη μόλυνση των καλλιεργειών με αφλατοξίνες παίζει ο τύπος του εδάφους στο οποίο αυτές αναπτύσσονται. Δείγματα που λήφθηκαν, πριν τη συγκομιδή, από καλαμπόκι που καλλιεργήθηκε σε αμμώδη εδάφη, είχαν υψηλότερη μόλυνση από αφλατοξίνες, σε σχέση με εκείνα που λήφθηκαν από καλαμπόκι που καλλιεργήθηκε σε πιο βαριά, αργιλώδη εδάφη (Jones και συν., 1981). Η διαφορά αποδόθηκε στην επιπρόσθετη καταπόνηση του φυτού, λόγω της μειωμένης διαθεσιμότητας νερού στα πιο ελαφρά, αμμώδη εδάφη. Έχει αποδειχτεί ότι τόσο ο τύπος του εδάφους, όσο και οι καλλιεργητικές πρακτικές επηρεάζουν το φορτίο των σπόρων

και τη μόλυνση από αφλατοξίνη (Angle, 1987). Τα αμμώδη εδάφη των νοτιο-ανατολικών Ηνωμένων Πολιτειών έχουν λιγότερη από τη μισή ικανότητα κατακράτησης νερού, σε σχέση με τα περισσότερα εδάφη της "ζώνης καλλιέργειας καλαμποκιού" της αμερικανικής ηπείρου (κεντρο-δυτικά), οπότε αυξάνεται η πιθανότητα εμφάνισης καταπόνησης λόγω ξηρασίας κατά την περίοδο ανάπτυξης των φυτών (Widstrom, 1992). Παρόλο που το συντηρητικό όργανο (μέθοδος οργώματος που αφήνει το λιγότερο 30% των υπολειμμάτων της καλλιέργειας στην επιφάνεια του εδάφους) μειώνει την απώλεια σε νερό των εδαφών, η πράξη αποδεικνύει ότι τέτοιες πρακτικές αυξάνουν το φορτίο σπόρων του *Aspergillus flavus*, που μολύνουν την καλλιέργεια που ακολουθεί στην αμεινισπορά (Angle, 1987).

2.1 Προσαρμογές για επιβίωση στο έδαφος

Οι *Aspergillus flavus* και *A. parasiticus* είναι καλά προσαρμοσμένοι για την επιβίωση στο έδαφος, και μπορεί να υπάρχουν ως κονίδια, σκληρώτια, ή υφές. Η ταυτοποίηση των υφών και κονιδίων στο έδαφος, είτε με άμεση παρατήρηση, είτε έμμεσα, με την τεχνική των διαδοχικών αραιώσεων, παρουσιάζει πολλές δυσκολίες (Klich και συν., 1992). Οι ασπέργιλλοι σπορογονούν άφθονα στη φύση, και οι αποικίες που προκύπτουν από τις διαδοχικές αραιώσεις πιθανότατα σχηματίζονται από αδρανή κονίδια. Οπότε, τα πληθυσμιακά δεδομένα που συλλέγονται με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων δείχνουν τη δυνατότητα των μυκήτων αυτών για αποικισμό των φυτών και άλλων υποστρωμάτων, αλλά παρέχουν ελάχιστες πληροφορίες για την τρέχουσα δραστηριότητά τους στο έδαφος. Τα κονίδια συνήθως παράγονται από πληθυσμούς των *A. flavus* και *A. parasiticus* σε καλλιέργειες (Wicklow και συν., 1998· McAlpin και συν., 1998), και λειτουργούν ως ανθεκτικές δομές επιβίωσης απέναντι σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Παρόλο που τα σκληρώτια είναι μορφολογικά παρόμοια με τα στρώματα του *Petromyces alliaceus*, ενός είδους του τμήματος *Flavi*, που - σποραδικά- παράγει ασκοσπόρια μέσα σε στρώματα (Klich, 2002), ένα φυλετικό στάδιο δεν έχει συνδεθεί ποτέ με τα σκληρώτια των *A. flavus* και *A. parasiticus*. Οι Wicklow και συν. (1993) απέδειξαν ότι η πλειονότητα των σκληρωτίων επιβίωσε μετά από ταφή για 3 έτη στο Ιλινόις και στην Τζόρτζια. Η επιβίωση ήταν μικρότερη στην επιφάνεια του εδάφους (Wicklow, 1987).

Τα κονίδια των αφλατοξινογόνων μυκήτων, όταν προστεθούν στο έδαφος, χάνουν βραδέως τη βιωσιμότητά τους (Horn και συν., 1994). Οι Wicklow και συν., (1993) εξέτασαν διαφορές στη βιωσιμότητα των κονιδίων του *Aspergillus flavus* και του *A.*

parasiticus, για χρονική περίοδο 3 ετών, ανάμεσα στις βόρειες (Ιλινόις) και νότιες (Τζόρτζια) περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών. Τα κονίδια του *A. flavus* δεν ανιχνεύθηκαν στο έδαφος καμιάς περιοχής στο τέλος του πειράματος, ενώ εκείνα του *A. parasiticus* παρέμειναν πολύ βιώσιμα στο Ιλινόις, αλλά όχι και στην Τζόρτζια. Οι υψηλές πυκνότητες των εδαφών της Τζόρτζια σε αφλατοξινογόνους μύκητες, παρ' όλη την αυξημένη θνησιμότητα των κονιδίων, μπορεί να οφείλονται στην προσθήκη μεγάλων ποσοτήτων με ενοφθαλμισμό, από καλλιέργειες μολυσμένες με αφλατοξίνες, ως αποτέλεσμα των υψηλών θερμοκρασιών και της συχνής ξηρασίας στις νότιες περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών (Wicklow και συν., 1993). Επομένως, οι πληθυσμιακές διακυμάνσεις στο έδαφος αντανακλούν την κονιδιακή θνησιμότητα, που αντιμετωπίζεται από την εισροή ενοφθαλμισμάτων από μολυσμένες καλλιέργειες και/ή αποικισμό από οργανική ύλη (Horn και συν., 1995).

Το έδαφος χρησιμεύει ως δεξαμενή ενοφθαλμισμού, η οποία είναι απαραίτητη για τη μόλυνση καλλιεργειών ευαίσθητων στην επιβάρυνση με αφλατοξίνες. Η εναέρια καρποφορία καλλιεργειών, όπως το καλαμπόκι, το βαμβάκι, και οι ξηροί καρποί, υπαγορεύει σημαντικές διαφορές στον τρόπο της μόλυνσης, σε σύγκριση με την υπόγεια καρποφορία της αραχίδας (αράπικο φιστίκι) (Payne, 1998). Οι εναέριες καλλιέργειες μολύνονται από κονίδια του *Aspergillus flavus* που διασπείρονται από τον αέρα και μεταφέρονται με έντομα, αν και είναι συνήθως δύσκολο να καθοριστεί αν τα κονίδια αποτελούν πρωταρχικό υλικό ενοφθαλμισμού από το έδαφος, ή δευτερεύον, από άλλες μολυσμένες καλλιέργειες. Η σπορογονία σε συντρίμματα καλλιεργειών που αποτίθενται στην επιφάνεια του εδάφους είναι ξεκάθαρα μια πηγή ενοφθαλμισμού. Αυτό έχει αποδειχτεί πειραματικά με βιολογικό έλεγχο, στον οποίο μη τοξινογόνα στελέχη των *A. flavus* και *A. parasiticus* σπορογονούν άφθονα σε ενοφθαλμισμένο σιτάρι που έχει διασκορπιστεί πάνω στην επιφάνεια του εδάφους. Το καλαμπόκι και ο βαμβακόσπορος μολύνονται με μη τοξινογόνα στελέχη, που μειώνουν την παραγωγή αφλατοξίνης, ανταγωνιζόμενα με τους αφλατοξινογόνους μύκητες (Cotty, 1994· Dörner και συν., 1999). Οι Olanya και συν. (1997) έδειξαν ότι ο *A. flavus* σπορογονεί σε απορρίμματα καλαμποκιού που έχουν διασκορπιστεί στην εδαφική επιφάνεια, δημιουργώντας μια γραμμική κλίση διασποράς των εναέριων κονιδίων, μακριά από τα αποθέματα καλαμποκιού. Επιπρόσθετα, η μεταφερόμενη με τους ανέμους σκόνη, που περιέχει κονίδια του *A. flavus*, μπορεί να μολύνει άμεσα την καλλιέργεια. Το βαμβάκι στην Αριζόνα μολύνθηκε με αφλατοξίνες, όταν χώμα εμφυσήθηκε τεχνητά πάνω από την καλλιέργεια (Lee και συν., 1986), ενώ η σκόνη που συνδέεται με όργωμα έχει

ενοχοποιηθεί για τη μόλυνση κελυφωτών φιστικιών (Doster και Michailides, 1994b). Τέλος, τα έντομα διασπείρουν κονίδια αφλατοξινογόνων μυκήτων άμεσα, από το χώμα στην καλλιέργεια. Ειδικοί συνδυασμοί εντόμου – καλλιέργειας έχουν επανειλημμένα συνδεθεί με μόλυνση από αφλατοξίνη (Dowd, 2003). Για τα έντομα, η επιβίωση στις εποχές του έτους, η εξάπλωση στις διάφορες περιοχές, και η αύξηση του πληθυσμού τους, αποτελούν παραμέτρους που επηρεάζονται από τις εκάστοτε κλιματικές συνθήκες. Τα έντομα του εδάφους, στις καλλιέργειες καλαμποκιού, υποκρύπτουν τους μύκητες *A. flavus* και *A. parasiticus*, τόσο εξωτερικά, όσο και εσωτερικά (Lillehoj και συν., 1980). Οι Lussenhop και Wicklow (1990), έδειξαν ότι τα σκαθάρια της οικογένειας *Nitidulidae* εμπλέκονται στη μόλυνση του καλαμποκιού, στις νότιες περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών. Θαμμένα στελέχη καλαμποκιού (ψίχα με σπόρους) που είχαν ξεχειμωνιάσει, έδειξαν ορατή σπορογένεση του *A. flavus*, και συνδέθηκαν με σκαθάρια, το 68% των οποίων είχαν μολυνθεί με το συγκεκριμένο μύκητα, τη στιγμή της ανάπτυξης του "θηλυκού" τμήματος του φυτού του καλαμποκιού· του "μεταξιού - silk". Τα σκαθάρια προσελκύστηκαν σε αναπτυσσόμενα φυτά που είχαν τραυματιστεί από άλλα έντομα, όπως ο "σκώληκας" του καλαμποκιού, και τα φυτά μολύνθηκαν από ένα φαινοτυπικά διακριτό στέλεχος του *A. flavus*, το οποίο μεταφέρθηκε από τα θαμμένα καλαμπόκια. Σε αντίθεση με τις εναέριες καλλιέργειες, τα φιστίκια (αραχίδα-αράπικο φιστίκι) μολύνονται μέσω άμεσης επαφής με το έδαφος (χώμα). Οι καρποί από μακροσκοπικά ακέραια κελύφη, μολύνονται μέσω μιας ελάχιστα κατανοητής διαδικασίας εισβολής, που αφορά στη διείσδυση των υφών του μύκητα στο περικάρπιο του κελύφους (Xu και συν., 2000). Στον πιο συχνό τρόπο μόλυνσης, τα κελύφη και οι καρποί τραυματίζονται από διάφορα αρθρόποδα, και καθίστανται πολύ ευαίσθητα στην εισβολή αφλατοξινογόνων μυκήτων. Οι προνύμφες του αποκαλούμενου "τρυπητή" του καλαμποκιού, ενός λεπιδόπτερου με την επιστημονική ονομασία *Elasmopalpus lignosellus*, είναι υπεύθυνες για τις αμυχές και τη διείσδυση στο κέλυφος του φιστικιού, στις νοτιοανατολικές περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών (Bowen και Mack, 1993), ενώ σε τροπικές περιοχές ανά τον κόσμο, οι λευκές κάμπιες, οι τερμίτες, και οι σαρανταποδαρούσες, προκαλούν σημαντική ζημιά (Lynch και συν., 1997). Τα αρθρόποδα αυτά είναι πιο ζημιογόνα στα κελύφη των φιστικιών σε έδαφος ξηρό, με θερμοκρασίες ανεβασμένες· συνθήκες που ευνοούν το στρες ξηρασίας στη φιστικιά. Τα φιστίκια που έχουν υποστεί καταπόνηση λόγω ξηρασίας έχουν μειωμένη αντίσταση στην εισβολή από αφλατοξινογόνους μύκητες, το οποίο μερικώς οφείλεται στην

αναστολή παραγωγής φυτοαλεξίνης, ενός αντιμικροβιακού παράγοντα που παράγεται φυσιολογικά από το φυτό (Dorner και συν., 1989).

Σκληρώτια του *A. flavus* έχουν αναφερθεί σε σπόρους καλαμποκιού πριν τη συγκομιδή (Wicklow και συν., 1984), και στην ψίχα του στελέχους του, μετά από ξεχειμώνιασμα στην επιφάνεια του εδάφους (Zummo και Scott, 1990). Επιπρόσθετα, σκληρώτια του *A. parasiticus* ανιχνεύτηκαν σε τραυματισμένους από έντομα σπόρους αράπικου φιστικιού (Horn και συν., 1994), ενώ μεγάλοι αριθμοί των μικρών σκληρωτίων των *S* στελεχών του *A. flavus*, μπορεί να σχηματιστούν στο αναπτυσσόμενο βαμβάκι (Garber και Cotty, 1997).

Ο τρόπος μόλυνσης από τα σκληρώτια των αφατοξινογόνων μυκήτων, και η σημασία των σκληρωτίων στα αγροτικά οικοσυστήματα είναι ελάχιστα κατανοητά. Η σπορογονική εκβλάστηση των σκληρωτίων έχει αποδειχτεί κάτω από εργαστηριακές συνθήκες, καθώς επίσης και στην επιφάνεια του εδάφους (Wicklow και Donahue, 1984· Wicklow και Wilson, 1986). Η πυκνότητα του εδάφους στους μύκητες *Aspergillus flavus* και *A. parasiticus* αυξάνει σημαντικά, όταν γειτνιάζουν με βυθισμένα σκληρώτια, λόγω των κονιδίων που παράγονται από τη σπορογονική εκβλάστηση (Wicklow και συν., 1993). Τα σκληρώτια των δύο ειδών μπορούν επίσης να βλαστήσουν στο έδαφος, παράγοντας μυκήλια, και, επομένως, να εισβάλλουν άμεσα στο υπόστρωμα. Οι Stack και Pettit (1984) ανέφεραν αποικισμό οργανικής ύλης μέσω μυκηλιογονικής εκβλάστησης σκληρωτίων του μύκητα *A. flavus*. Ομοίως, παρατηρήθηκε υψηλή μόλυνση φιστικιών με το μύκητα *A. parasiticus*, όταν -σε πειραματικές μελέτες- το έδαφος ενοφθαλμίστηκε με σκληρώτια (Horn και συν., 1994). Δίχως στοιχεία σπορογονικής εκβλάστησης, έγινε η υπόθεση ότι η μόλυνση πιθανά έλαβε χώρα με την εισβολή μυκηλίων από εκβλάστηση σκληρωτίων.

Οι Wicklow και συν. (1984) κατέγραψαν το διασκορπισμό των σκληρωτίων πάνω στο έδαφος, κατά τη διάρκεια θεριζοαλωνισμού πέντε καλλιεργειών αραβόσιτου στις νότιες περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών. Μικρές ποσότητες σκληρωτίων του *A. flavus* απομονώθηκαν από τραυματισμένους από έντομα σπόρους, πριν τη συγκομιδή, και από άχυρα και συντρίμματα που εξέρχονται από τη θεριζοαλωνιστική μηχανή. Εκτεταμένη δειγματοληψία εδάφους μετά τη συγκομιδή, κατέληξε στην ανάκτηση μόνο δύο σκληρωτίων, από τον αγρό με την υψηλότερη μόλυνση. Επειδή το έδαφος από τις ίδιες καλλιέργειες είχε υψηλές συγκεντρώσεις σε πολλαπλασιαστικό υλικό (700 με 7400 CFU/g), που πιθανά αντιπροσώπευαν κονίδια και υφές, η σημασία των σκληρωτίων μπορεί να είναι ελάχιστη. Αντίθετα, τα σκληρώτια μπορεί να έχουν μεγαλύτερη

σημασία σε φυσικά περιβάλλοντα ή σε εκτάσεις αγρανάπαυσης, όπου οι εδαφικοί πληθυσμοί των αφλατοξινογόνων μυκήτων είναι πολύ χαμηλοί, και όπου τα προτιμώμενα υποστρώματα, όπως οι σπόροι, είτε είναι σπάνια, είτε δεν είναι άμεσα διαθέσιμα.

Η ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στον τραυματισμό από έντομα και στη μόλυνση με αφλατοξίνες του φιστικιού είναι καλά καθιερωμένη, ωστόσο οι πηγές ενοφθαλμισμού και η σχετική τους σπουδαιότητα απαιτούν περαιτέρω μελέτες. Η άμεση έκθεση ενός πρόσφατα δημιουργηθέντος τραύματος, στο περιβάλλον χώμα, επιτρέπει την εισβολή των μυκήτων *A. flavus* και *A. parasiticus*. Τα κονίδια των μυκήτων αυτών κανονικά είναι αδρανή στο χώμα, ακόμα και εντός της γεωκαρπόσφαιρας του αναπτυσσόμενου κελύφους του φιστικιού (Griffin, 1972). Ζημιά στο κέλυφος διεγείρει την εκβλάστηση των παρακείμενων στο τραύμα κονιδίων του *A. flavus* (Griffin, 1972), λόγω της απελευθέρωσης σακχάρων και αμινοξέων. Επίσης, τα σημεία τραυματισμού στους καρπούς ενδέχεται να μολυνθούν από υλικό ενοφθαλμισμού που μεταδίδεται με αρθρώποδα. Οι προνύμφες του *Elasmopalpus lignosellus* και τα ακάρεια που τρέφονται με μύκητες, προστατεύουν τα κονίδια του *A. flavus*, τόσο εξωτερικά, όσο και εσωτερικά, οδηγώντας τα τελευταία στα φιστίκια (Bowen και Mack, 1993). Ο διασκορπισμός των αρθροπόδων αυτών στα φιστίκια είναι δυνατός μόνο σε μικρές αποστάσεις στο εδαφικό περιβάλλον, σε σύγκριση με τις δυνητικά μεγάλες αποστάσεις διασποράς από τα ιπτάμενα έντομα, στις εναέριες καλλιέργειες. Οι προνύμφες του *Elasmopalpus lignosellus* μεταναστεύουν σε μικρές αποστάσεις, και έχουν αιχμαλωτιστεί σε παγίδες (Johnson και Smith, 1981). ωστόσο, τα εσωτερικά περιστατικά του *A. flavus* σε επιφάνεια απαλλαγμένη από προνύμφες, είναι συχνά λίγα (<10%) (Bowen και Mack, 1993), γεγονός που υποδηλώνει ότι ο *A. flavus* είναι συμπτωματικός, από το έδαφος, και δεν είναι προϊόν δευτερογενούς ενοφθαλμισμού από γειτονικά μολυσμένα κελύφη. Η λεπτομερής καταγραφή της κίνησης μεμονωμένων προνυμφών στο χώμα, κατά τη σίτισή τους, είναι απαραίτητη, για να αποσαφηνιστεί η σχέση ανάμεσα στη ζημιά που προκαλούν και στον αποικισμό από αφλατοξινογόνους μύκητες.

Η επίδειξη της επίδρασης της πυκνότητας του εδαφικού πληθυσμού στη μόλυνση της καλλιέργειας από αφλατοξινογόνους μύκητες, κάτω από συνθήκες αγρού, έχει αποδειχτεί δύσκολη, ιδιαίτερα με τις εναέριες καλλιέργειες, όπου ο πρωτογενής ενοφθαλμισμός δεν προσδιορίζεται με ευκολία. Τα φιστίκια φαίνεται να μην είναι ευαίσθητα στην πυκνότητα του πολλαπλασιαστικού υλικού των μυκήτων. Οι Griffin και

Garren (1974b) εκτίμησαν ότι η μόλυνση του κελύφους είναι δυνατή μόλις με 2.0 κονίδια του *Aspergillus flavus* σε ένα στρώμα της γεωκαρπόσφαιρας (έτσι καλείται η περιοχή όπου το κέλυφος επηρεάζει τη μικροβιακή σύσταση του εδάφους), πάχους 0.5 mm. Επιπρόσθετα, αύξηση στην πυκνότητα του εδάφους σε κονίδια του *A. parasiticus*, από 100 σε 10^5 CFU/g, οδήγησε σε αύξηση μόνο κατά 5% της συχνότητας μόλυνσης του καρπού, σε φιστίκια που είχαν υποστεί καταπόνηση λόγω ξηρασίας (Horn και συν., 1994). Η ξηρασία και οι ανεβασμένες θερμοκρασίες του εδάφους, που ευθύνονται για την αυξημένη ευαισθησία του φιστικιού στην προσβολή από *A. flavus* και *A. parasiticus*, ενδέχεται να είναι παράγοντες πιο σημαντικοί, από την πυκνότητα του εδάφους σε κονίδια, για τον καθορισμό της δριμύτητας μόλυνσης του καρπού του φιστικιού.

Γενικά, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, οι βροχοπτώσεις και η σχετική υγρασία, επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη μόλυνση με αφλατοξίνες.

2.2 Ο ρόλος των κλιματικών συνθηκών

Το κλίμα διαδραματίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στη μόλυνση των καλλιεργειών με αφλατοξίνες. Το συμπέρασμα αυτό είναι απόρροια επιστημονικών μελετών, αλλά και απόφθεγμα εμπειρίας των παραγωγών, χειριστών, επεξεργαστών, και εμπόρων μολυσμένων καλλιεργειών. Πράγματι, μέσα από την εμπειρία, αυτοί που επηρεάζονται περισσότερο γνωρίζουν ότι το κλίμα "υπαγορεύει" τη μόλυνση. Κατά τις περιόδους ξηρασίας, οι αγρότες φοβούνται ότι η μυστηριώδης αόρατη δύναμη που αναπτύσσεται μέσα στην καλλιέργεια μπορεί να υποβαθμίσει την αξία της. Σε ζεστές περιοχές, όπου οι αφλατοξίνες είναι ένας διαρκής κίνδυνος, οι αγρότες γνωρίζουν ότι βροχή κατά τη συγκομιδή ή κοντά σε αυτήν, έχει ως αποτέλεσμα μη αποδεκτές συγκεντρώσεις αφλατοξινών σε πολλές καλλιέργειες. Στις τροπικές χώρες, η ανομβρία και οι ημίξηρες έως ξηρές περιβαλλοντικές συνθήκες, συνδέονται με τη μόλυνση. Σε τέτοιες περιοχές, αλλαγές στα καιρικά πρότυπα ενδέχεται να οδηγήσουν σε οξεία αφλατοξίκωση και θανάτους (Lewis και συν., 2005). Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων το κλίμα επηρεάζει τη μόλυνση των καλλιεργειών με αφλατοξίνες, αποτελούν αντικείμενο της ενότητας αυτής.

2.2.1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

2.2.1.1 Θερμοκρασία

Η ξηρασία ορίζεται με βάση τις ξηρές συνθήκες που προκαλούν καταπόνηση στο φυτό, και συνήθως συνδέεται με υψηλότερες από τις κανονικές θερμοκρασίες. Τέτοιος καιρός συνήθως συνοδεύεται από τραυματισμούς από έντομα, και μυκητιακή μόλυνση του φυτού. Ο *Aspergillus flavus* είναι εξαιρετικά θερμοανθεκτικός, και ταιριάζει ιδανικά σε ένα οικοσύστημα που παράγει ξηρές συνθήκες και προκαλεί καταπόνηση στο φυτό λόγω θερμοκρασίας. Η ιδανική θερμοκρασία για την παραγωγή αφλατοξίνης είναι περίπου 30°C (Boller και Schroeder, 1974· Sorenson και συν., 1967), ενώ η θερμοκρασία ανάπτυξης του αραβόσιτου, για παράδειγμα, είναι περίπου 27°C (Shaw, 1977), παρόλο που είναι ακόμη χαμηλότερη, όταν το φυτό εκτίθεται σε συνθήκες ξηρασίας (Zuber και Lillehoj, 1987).

Έχει αποδειχτεί, ότι κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκηπίου η θερμοκρασία αποτελεί σημαντικό παράγοντα της μόλυνσης από τον *Aspergillus flavus* και της μόλυνσης από αφλατοξίνες που επακολουθεί (Payne και συν., 1988b· Thompson και συν., 1980). Η παρατήρηση επιβεβαιώθηκε από αρκετές μελέτες στον αγρό, στις οποίες οι θερμοκρασίες καταγράφονταν (Jones και συν., 1980· Zuber και συν., 1983). Κάποιες προσπάθειες που έγιναν, για να αποδειχθεί ότι υπάρχει κάποια σχέση ανάμεσα στη θερμοκρασία και στη μόλυνση από αφλατοξίνες, ήταν ανεπιτυχείς (Stoloff και Lillehoj, 1981). Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι μια ανιχνεύσιμη σχέση παρατηρείται μόνο στις χρονιές που η μόλυνση με αφλατοξίνες είναι υψηλή. Οι McMillian και συν. (1985a), διεξήγαγαν μια εξαετή μελέτη, στην οποία παρατήρησαν ότι η υψηλότερη μόλυνση ανιχνεύθηκε στη διάρκεια των 3 ετών που οι μέσες ημερήσιες θερμοκρασίες ήταν υψηλές και αυτό συνέβαινε κατά την περίοδο ανάπτυξης. Παρομοίως, σε μια πενταετή μελέτη, παρατηρήθηκε μια αξιοσημείωτη συσχέτιση ανάμεσα στη μόλυνση με αφλατοξίνες και στη θερμοκρασία, μόνο στα 2 έτη όπου υπήρχαν εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις αφλατοξινών (Widstrom και συν., 1990). Συμπερασματικά, οι υψηλές θερμοκρασίες συμβάλλουν αξιοσημείωτα στη διαδικασία της μόλυνσης από μύκητες και στη συνολική ποσότητα των αφλατοξινών που παράγονται.

2.2.1.2 Βροχόπτωση

Η αλληλεξάρτηση των κλιματικών παραγόντων, όπως η θερμοκρασία και οι βροχοπτώσεις, δε γίνεται να αγνοηθούν, αλλά καθένας τους έχει τη δική του μοναδική

συμβολή στο πρόβλημα της μόλυνσης με αφλατοξίνες. Διατυπώθηκε ότι οι διαφορές στην ποσότητα της βροχόπτωσης από περιοχή σε περιοχή, συμβάλλουν στη μόλυνση (Lillehoj και συν., 1978). Εποχές με πολύ χαμηλές βροχοπτώσεις δημιουργούν συνθήκες καταπόνησης στο καλαμπόκι που δεν ποτίζεται, και οι υψηλές θερμοκρασίες, που συχνά τις συνοδεύουν, συνδέονται με τη δριμύτητα της μόλυνσης με αφλατοξίνες. Όταν οι βροχοπτώσεις προς το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου εμποδίζουν την έγκαιρη συγκομιδή της σοδειάς, το προϊόν που λαμβάνεται από την καθυστερημένη συγκομιδή αναμένεται να έχει υψηλές συγκεντρώσεις αφλατοξινών (Jones και Duncan, 1981).

2.2.1.3 Σχετική υγρασία

Η σχετική υγρασία και η καθαρή εξάτμιση είναι περίπλοκα αλληλένδετες, καθώς αυτά τα δύο φαινόμενα είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης νερού και θερμοκρασίας. Η θερμότητα (ενέργεια) είναι απαραίτητη, για να συμβεί η εξάτμιση. Η ενέργεια χρειάζεται, για να σπάσουν οι δεσμοί που συγκρατούν τα μόρια του νερού μεταξύ τους. Για το λόγο αυτό, το νερό εξατμίζεται εύκολα στο σημείο βρασμού (212°F, 100°C), ενώ η εξάτμισή του είναι πολύ πιο βραδεία στο σημείο ψύξης (0°C). Η καθαρή εξάτμιση λαμβάνει χώρα, όταν ο ρυθμός εξάτμισης του νερού είναι μεγαλύτερος από το ρυθμό συμπύκνωσης. Μια κατάσταση κορεσμού επικρατεί, όταν οι δύο ρυθμοί είναι ίσοι, οπότε και η σχετική υγρασία της ατμόσφαιρας είναι 100%. Ο Lillehoj (1983), συζήτησε τις αλληλεπιδράσεις αυτές, λαμβάνοντας υπ' όψη την ενεργότητα του νερού, και επεσήμανε ότι η ενεργότητα του νερού από 0,9 και πάνω είναι ιδανική για την ανάπτυξη του *Aspergillus flavus* και τη σύνθεση αφλατοξινών. Αντίθετα, αν η ενεργότητα του νερού είναι μικρότερη από 0,85 μειώνει σημαντικά την παραγωγή αφλατοξινών. Σημαντικές ποσότητες αφλατοξινών δεν παράγονται σε ενοφθαλμισμένα δείγματα αραβόσιτου, όταν επωαστούν για 7 ημέρες σε σχετικές υγρασίες κατώτερες του 91% (Guo και συν., 1996). Η καθιέρωση και εφαρμογή περιβαλλοντικών ορίων για τη μυκητιακή ανάπτυξη και την επεξεργασία των αφλατοξινών σε εργαστηριακές μελέτες, μπορεί να είναι αποπροσανατολιστική, στην περίπτωση που οι πληροφορίες χρησιμοποιηθούν άμεσα στην καλλιέργεια, αλλά είναι ζωτικής σημασίας σε πειράματα για τη μελέτη των παραγόντων αυτών, κάτω από υψηλά μεταβαλλόμενες συνθήκες στον αγρό (Lillehoj, 1983). Ο Sisson (1987), κατέγραψε περιβαλλοντικές συνθήκες αγρών σε αρκετές πολιτείες της Αμερικής που καλλιεργούν καλαμπόκι, και κατέληξε στο ότι η υψηλή υγρασία και οι υψηλές θερμοκρασίες συμβάλλουν από κοινού σε μόλυνση με αυξημένες συγκεντρώσεις αφλατοξινών. Η συνηθισμένη παρουσία "βαριάς" πάχνης στις

νότιες περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών, που έχει ως αποτέλεσμα το βρέξιμο του καλαμποκιού τουλάχιστον 3 φορές την εβδομάδα, επίσης ευθύνεται για την αύξηση των συγκεντρώσεων αφλατοξινών (McMillian και συν., 1985b). Οι μετρήσεις της μέσης θερμοκρασίας στον αγρό και της καθαρής εξάτμισης, συσχετίζονται σημαντικά με τις συγκεντρώσεις σε αφλατοξίνες των δειγμάτων που λαμβάνονται κατά τη συγκομιδή. Οι μετρήσεις αυτές κρίνεται ότι είναι πιο σημαντικές από τη σχετική υγρασία, ή τη συνολική βροχόπτωση, στον καθορισμό της μόλυνσης (McMillian και συν., 1985a).

2.2.2 Αφλατοξινογόνοι μύκητες και εξάρτησή τους από τις κλιματικές συνθήκες

Η ποσότητα των αφλατοξινογόνων μυκήτων που σχετίζεται με καλλιέργειες και εδάφη, ποικίλλει, ανάλογα με το κλίμα. Η ποσότητα του *A. flavus* που παράγεται σε ψυχρές περιοχές (μέγιστη θερμοκρασία < 20°C) είναι μειωμένη, συγκρινόμενη με εκείνη που παράγεται σε θερμότερες περιοχές (ελάχιστη θερμοκρασία > 25°C), όπου οι παραγωγοί αφλατοξινών είναι ευρέως διαδεδομένοι οπουδήποτε· σε εδάφη, στον αέρα, και στις επιφάνειες των καλλιεργειών (Shearer και συν., 1992). Οι καλλιέργειες που αναπτύσσονται σε θερμά κλίματα έχουν περισσότερες πιθανότητες να μολυνθούν από αφλατοξινογόνους μύκητες, και, σε μερικές περιοχές, η μόλυνση λαμβάνει χώρα μόνο όταν οι θερμοκρασίες ανεβαίνουν και συνδυάζονται με ξηρασία (Sanders και συν., 1984).

Οι αφλατοξινογόνοι μύκητες έχουν ως φυσικό περιβάλλον θερμές και ξηρές, ημί-ξηρες, και τροπικές περιοχές, με κλιματικές αλλαγές που καταλήγουν σε μεγάλες διακυμάνσεις στην ποσότητα των μυκήτων (Bock και συν., 2004). Στις θερμές και ημί-ξηρες περιοχές, όπως οι κοιλάδες και τα οροπέδια της ερήμου "Σόνοραν", στα σύνορα Ηνωμένων Πολιτειών και Μεξικού, η συντριπτική πλειοψηφία της οργανικής ύλης στα εδάφη αποικίζεται από τον *A. flavus* και στενά συγγενικούς μύκητες (Boyd και Cotty, 2001). Το κλίμα επηρεάζει όχι μόνο την ποσότητα, αλλά και το ποιοι αφλατοξινογόνοι μύκητες είναι παρόντες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αφλατοξινογόνους μύκητες που διαφέρουν γεωγραφικά (Horn και Dörner, 1999). Παρόλο που ο *A. flavus*, που παράγει μόνο Β αφλατοξίνες, είναι παρών σε καλλιέργειες πρακτικά σε όλες τις περιοχές που εξετάστηκαν, οι *A. parasiticus*, *A. nomius*, και αρκετά αταξινόμητα είδη, που όλα παράγουν τόσο Β, όσο και G αφλατοξίνες, συχνά απουσιάζουν ή σπανίζουν σε ορισμένες περιοχές (Cotty και Cardwell, 1999). Αυτές οι διαφορές στη δομή των μυκητιακών πληθυσμών αντανακλώνται στη σχετική αφθονία των Β και G αφλατοξινών σε καλλιέργειες που παράγονται σε διάφορες περιοχές (Cotty, 1997). Επιπρόσθετα, το

μέσο δυναμικό παραγωγής αφλατοξινών από τους μυκητιακούς πληθυσμούς ποικίλλει γεωγραφικά, με μερικές περιοχές να έχουν πληθυσμούς με μεγαλύτερες δυνατότητες παραγωγής αφλατοξινών, και, ως αποτέλεσμα, τα προϊόντα που καλλιεργούνται εκεί να είναι πιο ευαίσθητα στη μόλυνση (Jaime-Garcia και Cotty, 2006a,b). Έχει ήδη αναφερθεί ότι ο *A. flavus* είναι ο πιο σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας της μόλυνσης με αφλατοξίνες. Υπάρχει σε σύνθετους πληθυσμούς, στους οποίους συνυπάρχουν πολλές γενετικά απομονωθείσες ομάδες (Bayman και Cotty, 1993). Στελέχη που έχουν απομονωθεί από την ίδια καλλιέργεια μπορεί να ποικίλλουν ευρέως στην ικανότητά τους για παραγωγή αφλατοξινών (Cotty, 1997), καθιστώντας δύσκολη την εκτίμηση των κλιματικών επιπτώσεων στη μέση ικανότητα παραγωγής αφλατοξινών των πληθυσμών του *A. flavus*. Ωστόσο, οι δύο κύριοι μορφότυποι του *A. flavus*, τα στελέχη S και L, είναι εύκολα διακριτοί από τα χαρακτηριστικά των αποικιών τους (Cotty, 1989). Κατά μέσο όρο, τα S στελέχη παράγουν πολύ μεγαλύτερες ποσότητες αφλατοξινών, σε σύγκριση με τα L στελέχη, οπότε οι κλιματικές παράμετροι που επηρεάζουν τη συχνότητα των S στελεχών, επίσης επηρεάζουν τη μέση ικανότητα παραγωγής των συγκεκριμένων μυκοτοξινών.

2.2.3 Κλιματική επίδραση και στάδιο καλλιέργειας

Η μόλυνση με αφλατοξίνες μπορεί να διαιρεθεί σε δύο διακριτές φάσεις, με την προσβολή της αναπτυσσόμενης καλλιέργειας στην πρώτη φάση, και αυξήσεις στη μόλυνση μετά την ωρίμανση στη δεύτερη φάση (Cotty, 2001). Παρόλο που τα περιστατικά μόλυνσης συνήθως αποδίδονται σε μία από τις δύο φάσεις (για παράδειγμα, λόγω ανεπαρκών χειρισμών μετά τη συγκομιδή, ή λόγω τραυματισμών από έντομα στον αγρό), και οι δύο φάσεις συμβάλλουν σε πολλές περιπτώσεις μόλυνσης. Ο καιρός επηρεάζει τις δύο φάσεις της μόλυνσης με διαφορετικό τρόπο.

Οι αναπτυσσόμενες καλλιέργειες είναι συχνά πολύ ανθεκτικές στην προσβολή από *Aspergillus flavus* και στη μόλυνση που ακολουθεί από αφλατοξίνες, εκτός εάν οι περιβαλλοντικές συνθήκες ευνοούν τόσο τη μυκητιακή ανάπτυξη, όσο και την ευαισθησία της καλλιέργειας. Κατά την πρώτη φάση της μόλυνσης, ο τραυματισμός της αναπτυσσόμενης καλλιέργειας από πτηνά, θηλαστικά, έντομα, ο μηχανικός τραυματισμός (για παράδειγμα, από χαλαζόπτωση), ή η καταπόνηση που προκαλείται από ζεστές, ξηρές συνθήκες, έχουν ως αποτέλεσμα σημαντικές μολύνσεις (Dowd, 1998· Guo και συν., 2003· Odvody και συν., 1997). Το κλίμα μπορεί ακόμα να επηρεάσει άμεσα την ευαισθησία του φυτού-ξενιστή. Κάτω από ζέστη ή καταπόνηση λόγω

ξηρασίας, η παραγωγή φυτοαλεξίνης (πολυφαινόλη που έχει προστατευτικό ρόλο) ενδέχεται να μειωθεί, αυξάνοντας την ευαισθησία του αράπικου φιστικιού (Wotton και Strange, 1987), ενώ η ακεραιότητα των σπόρων του αραβόσιτου κινδυνεύει από την αύξηση του φαινομένου γνωστού ως "silk cut" (Odvody και συν., 1997) και τα κελυφωτά φιστίκια μπορεί να εμφανίσουν ράγισμα στο κέλυφος, που καλείται "early split – πρόωρη διάσπαση" (Hadavi, 2005). Τέτοιες συνθήκες ενδέχεται να ευνοήσουν και το μυκητιακό αποικισμό φυσιολογικά ωριμαζόντων τμημάτων των καλλιεργειών, όπως είναι τα νημάτια "μεταξιού" (corn silks) του αραβόσιτου, τα άνθη, ή οι μίσχοι, και την επακόλουθη μόλυνση των σπόρων. Στις καλλιέργειες που παρουσιάζουν τα σημαντικότερα προβλήματα μόλυνσης, η κατανομή και το φύτευμά τους διέπονται από ένα γενικότερο σχεδιασμό έτσι, ώστε να αποφευχθούν συνθήκες ευνοϊκές για τον *Aspergillus flavus*, και στις δύο φάσεις της μόλυνσης. Ωστόσο, ο καιρός δεν είναι σταθερός στην πάροδο των ετών, και όταν τα πρότυπά του αλλάζουν, ακόμα και καλά ρυθμιζόμενες καλλιέργειες μπορεί να εκτεθούν σε συνθήκες ευνοϊκές στη μόλυνση. Έτσι, όταν η ζέστη συνδυάζεται με ξηρασία, η μόλυνση μπορεί να διαδοθεί ακόμα και σε περιοχές που κανονικά είναι απαλλαγμένες από αφλατοξίνες.

Η δεύτερη φάση της μόλυνσης μπορεί να συμβεί οποιαδήποτε χρονική στιγμή· από την ωρίμανση της καλλιέργειας μέχρι την αποθήκευση του προϊόντος, τη μεταφορά, ή την κατανάλωσή του (Cotty, 2001). Η φάση αυτή συμβαίνει, όταν η ώριμη καλλιέργεια εκτίθεται σε ζεστές, υγρές συνθήκες, είτε στον αγρό, είτε κατά τη μεταφορά και αποθήκευση, ή τη χρήση (για παράδειγμα, στρωμή σε εκτροφές) (Cotty, 1991). Κάτω από υψηλή υγρασία, οι αρχικώς ξηροί σπόροι αναπτύσσουν περιεχόμενο νερού, που είναι ευαίσθητο στη μόλυνση. Η υγρασία και η θερμοκρασία υπαγορεύουν την έκταση της μόλυνσης. Οι συνθήκες που ευνοούν τους αφλατοξινογόνους μύκητες έχουν περιγραφεί επανειλημμένα (Cotty και συν., 1994). Όταν οι καλλιέργειες εκτίθενται μετά την ωρίμανση σε συνθήκες εντός αυτών των ορίων, η δεύτερη φάση της μόλυνσης προχωρά, είτε με την έλλειψη της απαιτούμενης διαχειριστικής παρέμβασης, είτε με την απουσία αποτελεσματικών μικροβιακών ανταγωνιστών. Συστάσεις μυκητιακών πληθυσμών που έχουν συγκροτηθεί κατά την πρώτη φάση, επηρεάζουν σημαντικά τη δεύτερη. Σε απροσδιόριστες χρονικά καλλιέργειες, όπως το βαμβάκι, συνήθως δε συμφέρει οικονομικά η συγκομιδή καθώς ωριμάζουν. Έτσι, τα πρώιμα στελέχη είναι εκτεθειμένα στις καιρικές συνθήκες στον αγρό, καθώς τα όψιμα ωριμάζουν. Οι επιπτώσεις της καθυστερημένης συγκομιδής στη μόλυνση είναι πιο σοβαρές όταν οι καλλιέργειες υποστούν βροχή μόλις πριν ή κατά τη συγκομιδή (Jaime-Garcia και Cotty,

2003). Το δεύτερο στάδιο συνεχίζεται κατά την "αποθήκευση" στον αγρό σε στοίβες ή μπάλες, κατά την ξήρανση (για παράδειγμα, σε καλλιέργειες ξηρών καρπών, κάτω από τέντες), ακόμα και στα χέρια του τελικού χειριστή – καταναλωτή (Waliyar και συν., 2003).

Η προσβολή των καλλιεργειών από μύκητες του γένους *Aspergillus*, και η μόλυνσή τους με αφλατοξίνες, συχνά αφορά και τις δύο φάσεις, και, σε απροσδιόριστες καλλιέργειες, και οι δύο φάσεις μπορεί να λαμβάνουν χώρα την ίδια χρονική στιγμή. Ωστόσο, εξετάζοντας τις δύο φάσεις ανεξάρτητα, γίνονται γνωστές περισσότερες πληροφορίες όσον αφορά στις κλιματικές επιδράσεις στη μόλυνση. Ένα παράδειγμα για το παραπάνω συμπέρασμα μπορεί να αντληθεί από την εμπειρία με την επίπτωση του «ροζ σκώληκα» (pink bollworm) στη μόλυνση με αφλατοξίνες του βαμβακόσπορου. Η προτιμώμενη "αγορά" για το βαμβακόσπορο είναι ως ζωοτροφή για τις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες και προβατίνες. Για να αποφευχθούν μη αποδεκτές συγκεντρώσεις αφλατοξινών στο γάλα, βαμβακόσπορος με συγκέντρωση πάνω από 20ppb δεν πρέπει να χρησιμοποιείται στο σιτηρέσιο των αγελάδων ή των προβατίνων. Ο βαμβακόσπορος που δεν εισέρχεται στην αγορά των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων έχει μειωμένη αξία (Cotty, 2001). Μικρής κλίμακας στατιστικές μελέτες πάνω στην επίπτωση του ροζ σκώληκα στη μόλυνση, υπέδειξαν ότι η ζημιά από το έντομο αυτό ήταν η κύρια αιτία μόλυνσης του βαμβακόσπορου Αριζόνας (Cotty και Lee, 1989). Το διαγονιδιακό Bt βαμβάκι (*Bt* – *Bacillus thuringiensis*) είναι πρακτικά απρόσβλητο από το ροζ σκώληκα, και θεωρήθηκε ότι θα είχε ασήμαντη επιβάρυνση με αφλατοξίνες (Berberich, 1995). Σε στατιστικές μελέτες, Bt καλλιέργειες έδειξαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα αφλατοξινών, συγκρινόμενες με συμβατικές καλλιέργειες. Ωστόσο, μία πρόωμη παρτίδα μεταλλαγμένου Bt βαμβακόσπορου, που καλλιεργήθηκε στην Αριζόνα, είχε συγκέντρωση σε αφλατοξίνες πάνω από 5.000 ppb (Cotty και συν., 1997). Το φαινόμενο αυτό αποδόθηκε στην έκθεση της ώριμης καλλιέργειας σε ζεστές και υγρές συνθήκες, που ευνόησαν τη δεύτερη φάση της μόλυνσης. Μια σημαντική σχέση ανάμεσα στην ημερομηνία συγκομιδής και στη συγκέντρωση σε αφλατοξίνες των εμπορικών καλλιεργειών, αποδείχτηκε, όταν η καθυστερημένη συγκομιδή συνδέθηκε με αύξηση αφλατοξινών (Bock και Cotty, 1999). Επομένως, η δεύτερη ήταν η πιο σημαντική φάση της μόλυνσης για την εμπορική καλλιέργεια. Το καθυστερημένο πότισμα, η βροχή, και η πάχνη στις θερμές περιόδους του έτους, κυριαρχούν στη δεύτερη φάση (Jaime-Garcia και Cotty, 2003). Παρόμοιες επιδράσεις του χρόνου συγκομιδής παρατηρήθηκαν στο νότιο Τέξας (Jaime-Garcia και Cotty, 2003), όπου η δεύτερη φάση επίσης κυριαρχεί,

όταν βρέχει μετά το άνοιγμα των μπαλών βαμβακιού (cotton bolls), εξηγώντας πάνω από το 60% της μεταβλητότητας των αφλατοξινών. Οι αυξήσεις στη συγκέντρωση των αφλατοξινών, που συνδέονται με το χρόνο συγκομιδής, είναι μεγαλύτερες σε καλλιέργειες που δέχονται πάνω από 50 mm βροχής κατά το άνοιγμα των μπαλών.

Όταν οι ευνοϊκές συνθήκες για τη δεύτερη φάση δε λαμβάνουν χώρα, οι τραυματισμοί των αναπτυσσόμενων καλλιεργειών (αραβόσιτος, βαμβακόσπορος, κελυφωτό φιστίκι, αράπικο φιστίκι) αποτελούν τον κυρίαρχο προδιαθεσικό παράγοντα, και οι μεταλλαγμένες Bt καλλιέργειες αναμένεται να εμφανίσουν σημαντικά μειωμένη μόλυνση. Όταν ώριμες καλλιέργειες εκτίθενται σε συνθήκες που ευνοούν τη δεύτερη φάση, ο περιορισμός της μόλυνσης ενδέχεται να μην είναι σημαντικός σε Bt καλλιέργειες. Με παρόμοιο τρόπο, η διαίρεση της διαδικασίας της μόλυνσης σε δύο φάσεις επιτρέπει βελτιωμένη εκτίμηση των επιπτώσεων διαφόρων κλιματικών συμβάντων πάνω στη μόλυνση, ανεξάρτητα από το εάν πρόκειται για καλλιέργεια καλαμποκιού που εκτίθεται σε ξηρασία κατά την ανάπτυξη, και βροχή μόλις πριν τη συγκομιδή (Lewis και συν., 2005), ή για καλλιέργεια αράπικου φιστικιού που εκτίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες κατά την ωρίμανση του φλοιού, και βροχή μόλις πριν τη συγκομιδή (Pettit και Taber, 1968).

2.2.4 Επιπτώσεις στη γεωργία και μελλοντικοί προβληματισμοί

Η μόλυνση με αφλατοξίνες περιορίζει την παραγωγικότητα των καλλιεργειών σε εκατομμύρια εκτάρια γης στις Ηνωμένες Πολιτείες, όπου η μόλυνση έχει προκαλέσει την απομάκρυνση καλλιεργειών αραβόσιτου και αράπικου φιστικιού από ορισμένες περιοχές (Robens και Cardwell, 2003). Σε άλλες περιοχές, η μόλυνση του αραβόσιτου και του βαμβακόσπορου με αφλατοξίνες επηρεάζει αρνητικά τη βιωσιμότητα ολόκληρων αγροτικών κοινωνιών. Καθώς το κλίμα γίνεται θερμότερο, και τα καιρικά πρότυπα γίνονται πιο ασταθή, η μόλυνση από αφλατοξίνες ενδέχεται να περιορίσει περαιτέρω τις περιοχές στις οποίες τα διάφορα προϊόντα μπορούν να καλλιεργηθούν με οικονομικό κέρδος. Ο αραβόσιτος έχει γίνει αγαθό πρώτης ανάγκης για πολλά εκατομμύρια ανθρώπων σε θερμές περιοχές, στην Αφρική, στην Ασία και στην Αμερική. Η καλλιέργεια αυτή είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στις κλιματικές επιδράσεις, όπως αποδεικνύουν πρόσφατα περιστατικά θανατηφόρων αφλατοξικών σε στην Κένυα (Lewis και συν., 2005). Είναι αναγκαία η ανάπτυξη αξιόπιστων μεθόδων, για να αποφευχθεί μελλοντικά η έκθεση μεγάλων ανθρώπινων πληθυσμών σε μη αποδεκτά επίπεδα αφλατοξινών. Οι τεχνολογίες διαχείρισης αφλατοξινών, η αποτοξίνωση, και η

προσαρμογή των καλλιεργητικών πρακτικών, αποτελούν δυνητικές λύσεις στο πρόβλημα.

2.3 Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξινών

Εκτός από τις κλιματικές συνθήκες, την παραγωγή αφλατοξινών επηρεάζουν και άλλοι παράγοντες, όπως οι διατιθέμενες πηγές άνθρακα και αζώτου, καθώς και διάφοροι φυσικοί μεταβολίτες των φυτών (Bhatnagar και συν., 2003· Calvo και συν., 2002).

Τα υψηλότερα επίπεδα αφλατοξινών παράγονται, όταν ο μύκητας εισβάλλει στο έμβρυο του σπόρου, όπου υπάρχουν τα μεγαλύτερα επίπεδα απλών σακχάρων (γλυκόζη και σουκρόζη), σε σχέση με άλλα τμήματα του σπόρου, όπου κυριαρχούν οι σύνθετοι υδατάνθρακες (Woloshuk και συν., 1997). Η βιοσύνθεση αφλατοξινών είναι γνωστό ότι αυξάνεται με απλούς υδρογονάνθρακες, όπως η γλυκόζη και η σουκρόζη (Payne και Brown, 1998), αλλά όχι και με την πεπτόνη, ή σύνθετα σάκχαρα, όπως το άμυλο. Είναι ενδιαφέρον ότι μια ομάδα γονιδίων που χρησιμοποιεί εξόζη (π.χ. γλυκόζη) βρίσκεται γειτονικά στο σύμπλεγμα γονιδίων αφλατοξίνης, και ενδέχεται να επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων αυτών (Yu και συν., 2000a). Τα αποθέματα αζώτου, δεν αποτελούν συνήθως περιοριστικό παράγοντα στις καλλιέργειες στις Η.Π.Α. (Payne, 1998), αλλά αμινοξέα του φυτού, που εξαρτώνται από το άζωτο, έχει αναφερθεί ότι είναι απαραίτητα στη ρύθμιση του σχηματισμού τοξίνης (Thapar, 1988). Η νιτρική καταστολή της σύνθεσης αφλατοξίνης σε κάποια απομονωθέντα στελέχη *Aspergillus* έχει τεκμηριωθεί επαρκώς (Niehaus και Jiang, 1989), ενώ το άζωτο που παρέχεται με τη μορφή αμμωνίου, υποστηρίζει το σχηματισμό τοξίνης. Η αιτία της ανασταλτικής δράσης των νιτρικών είναι ακόμα αβέβαιη, ωστόσο στην αναστολή αυτή ενδέχεται να μεσολαβεί ο μεταγραφικός παράγοντας AreA, που προέρχεται από νιτρικά (Chang και συν., 2000). Ο AreA δεσμεύεται στην τετρανουκλεοτιδική περιοχή αναγνώρισης, GATA, στους υποκινητές των γονιδίων *aflR* και *aflJ*, και επηρεάζει την έκφρασή τους (Ehrlich και συν., 1999). Κάποια στελέχη *A. flavus* αποκρίνονται διαφορετικά στα νιτρικά, σε σχέση με άλλα στελέχη, και οι διαφορές αυτές συσχετίζονται με διαφορές στον αριθμό των περιοχών GATA, κοντά στην περιοχή έναρξης μεταγραφής του γονιδίου *aflJ* (Ehrlich και Cotty, 2002).

Όσον αφορά στους φυσικούς φυτικούς μεταβολίτες, προγενέστερες ερευνητικές προσπάθειες έδειξαν ότι πτητικές ουσίες που παράγουν τα φυτά, μεταβάλλουν είτε την ανάπτυξη του *Aspergillus*, είτε την παραγωγή αφλατοξινών. Στις ουσίες αυτές περιλαμβάνονται οι πτητικές αλδεΐδες, και άλλες ουσίες από τα φύλλα του αειθαλούς

δέντρου αζαδιραχτίνη (*Azadirachta indica*) (Bhatnagar και McCormick, 1988), του βαμβακιού (Zeringue και McCormick, 1990), και του καλαμποκιού (Wilson και συν., 1981). Οι ανθοκυανίνες και συγγενή φλαβονοειδή, επίσης επηρεάζουν τη βιοσύνθεση αφλατοξινών (Norton, 1999). Σε ορισμένες περιπτώσεις, η ανάπτυξη δεν επηρεάστηκε σημαντικά από διάφορους μεταβολίτες, ενώ η βιοσύνθεση αφλατοξινών παρουσίασε αξιοσημείωτη μείωση (Greene-McDowelle και συν., 1999· Wright και συν., 2000).

Τα οξυ-λιπίδια του φυτού, 13-υδροπεροξυ-λινολεϊκό οξύ και 9-υδροπεροξυ-λινολεϊκό οξύ, καθώς και ο πρόδρομός τους, το λινολεϊκό οξύ, επηρεάζουν την αγενή και εγγενή σπορογένεση στον *A. nidulans*, την εξέλιξη των σκληρωτίων, και τη σύνθεση τοξίνης (Burow και συν., 1997· Calvo και συν., 1999). Η μετατροπή του ολεϊκού οξέος (18:1) σε λινολεϊκό οξύ (18:2), είναι ένα κρίσιμο βιοσυνθετικό βήμα στη δημιουργία σπορογόνων ψ παραγόντων (πολυακόρεστα λιπαρά οξέα). Η μετατροπή αυτή γίνεται με τη μεσολάβηση μιας δέλτα-12 δεσaturάσης. Οι Calvo και συν. (2001) εντόπισαν και κλωνοποίησαν το γονίδιο δέλτα-12 δεσaturάση (*odeA*), από τους *A. nidulans* και *A. parasiticus*. Ένα μεταλλαγμένο ως προς το γονίδιο *odeA* στέλεχος του *A. parasiticus*, επέδειξε καθυστερημένη εκβλάστηση των σπόρων, διπλάσια μείωση στην ανάπτυξη, μειωμένα επίπεδα παραγωγής κονιδίων, και παντελή έλλειψη της εξέλιξης των σκληρωτίων, σε σύγκριση με τον "άγριο" τύπο του μύκητα (Wilson και συν., 2004). Είναι πιθανό ότι οι σπορογόνες ιδιότητες του λινολεϊκού οξέος και των υδροπεροξυ-λινολεϊκών οξέων, λαμβάνουν χώρα μέσω της μετατροπής των μορίων αυτών σε ψ παράγοντα, ή παρεμβαίνοντας με και/ή μιμούμενοι τον ψ παράγοντα, λόγω της υψηλής δομικής ομοιότητας μεταξύ αυτών των 18:2 λιπαρών οξέων.

Επιπρόσθετα, η βιοσύνθεση αφλατοξινών αναστέλλεται από το γαλλικό οξύ, που παράγεται από την υδρόλυση του ταννικού οξέος στους ξηρούς καρπούς (Mahoney και Molyneux, 2004). Κατά την εισβολή του *A. flavus*, η ταννάση του μύκητα απελευθερώνει γαλλικό οξύ, από το ταννικό οξύ που βρίσκεται στη μεμβράνη του καρυδίου και στο κέλυφος του φιστικιού Αιγίνης. Το γαλλικό οξύ είναι αντιοξειδωτικό, και μπορεί να καταστείλει κάποια από τα οξειδωτικά βήματα που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση αφλατοξινών (Jayashree και Subramanyam, 2000).

2.4. Πιθανοί παράγοντες βιοελέγχου για την αντιμετώπιση των αφλατοξινών στα φυτά

2.4.1 Βακτήρια

Διάφορα είδη βακτηρίων, όπως τα *Bacillus subtilis*, *Lactobacilli spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Ralstonia spp.*, και *Burkholderia spp.*, έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη μυκήτων και την παραγωγή αφλατοξινών από τα *Aspergillus spp.* σε εργαστηριακά πειράματα. Ο Palumbo και οι συνεργάτες του, το 2006, ανέφεραν ότι ένας αριθμός στελεχών των *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* and *Burkholderia*, που απομονώθηκαν από δείγματα αμυγδάλων, ανέστειλαν πλήρως την ανάπτυξη του *A. flavus*. Διάφορα στελέχη των *B. subtilis* και *P. solanacearum*, που απομονώθηκαν από το έδαφος καλλιέργειας καλαμποκιού, ανέστειλαν τη συσσώρευση των αφλατοξινών (Nesci και συν., 2005). Στις περισσότερες περιπτώσεις, παρόλο που τα συγκεκριμένα στελέχη ήταν πολύ αποτελεσματικά έναντι της παραγωγής αφλατοξινών και της ανάπτυξης των μυκήτων σε συνθήκες εργαστηρίου, δεν είναι επαρκή στο πεδίο (Dorner, 2004).

2.4.2 Ζύμες

Μερικά στελέχη σαπροφυτικών ζυμών (*Candida krusei* και *Pichia anomala*) αποτελούν πιθανούς παράγοντες βιοελέγχου έναντι του *A. flavus*. Παρόμοια με τα βακτηριακά στελέχη, αυτά τα στελέχη των ζυμών ανέστειλαν την ανάπτυξη του *Aspergillus* σημαντικά, κάτω από εργαστηριακές συνθήκες (Masoud και Kaltoft, 2006). Παρ' όλα αυτά, χρειάζονται περισσότερα πειράματα πεδίου για τον έλεγχο της επάρκειάς τους στη μείωση της μόλυνσης από αφλατοξίνες.

2.4.3 Μη τοξινογόνα στελέχη του Aspergillus

Η βέλτιστη αντιμετώπιση των αφλατοξινών επιτεύχθηκε σε καλλιέργειες πριν και μετά τη συγκομιδή μέσω εφαρμογής των ανταγωνιστικών μη τοξιγενών στελεχών του *Aspergillus flavus* και του *A. parasiticus*. Σε πολλά πειράματα στο πεδίο, ιδιαίτερα σε καλλιέργειες φιστικιού και βαμβακιού, παρατηρήθηκαν σημαντικές μειώσεις στη μόλυνση με αφλατοξίνες της τάξεως 70% - 90% έπειτα από τη χρήση των μη τοξιγενών στελεχών του *Aspergillus* (Dorner, 2004· Pitt και Hocking, 2006· Dorner, 2008). Πρόσφατα, δύο προϊόντα των μη τοξικογενών στελεχών εγκρίθηκαν από την Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος ως βιοεντομοκτόνα, για τον έλεγχο της μόλυνσης με αφλατοξίνες σε ποικιλίες βαμβακιού και φιστικιού σε αρκετές χώρες (Dorner, 2004).

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην εφαρμογή των μη τοξιγενών στελεχών που έχει ως στόχο τον ανταγωνιστικό αποκλεισμό των τοξικών στελεχών στα ίδια υποστρώματα της καλλιέργειας. Για να είναι αποτελεσματικός ο ανταγωνιστικός αποκλεισμός, τα μη τοξινογόνα στελέχη πρέπει να είναι κυρίαρχα στα γεωργικά περιβάλλοντα, όταν οι καλλιέργειες είναι επιρρεπείς στη μόλυνση από τα τοξινογόνα στελέχη.

2.5 Παράγοντες που επηρεάζουν τα μη τοξιγενή στελέχη *Aspergillus spp* στη μείωση της μόλυνσης από αφλατοξίνες

2.5.1 Διαμόρφωση

Η διαμόρφωση είναι ο συνδυασμός του ανταγωνιστικού στελέχους και του μεταφορέα υποστρώματος. Στις αρχικές μελέτες με φιστίκια, παρόλο που η άμεση εφαρμογή εναιωρήματος ομογενοποιημένης καλλιέργειας του μη τοξιγενούς *A. parasiticus* στα φυτά ή απευθείας στην επιφάνεια του εδάφους πριν από τη φύτευση ήταν πολύ αποτελεσματική, μειώνοντας σημαντικά τη μόλυνση από αφλατοξίνες, ήταν όμως πολύ δαπανηρή σαν μέθοδος για μεγάλης κλίμακας πεδία (Dorner και συν., 1992).

Αργότερα, χρησιμοποιήθηκαν στερεά υποστρώματα, όπως το σιτάρι και το ρύζι, για την παραγωγή του βιολογικού ελέγχου. Σε αυτή τη διαδικασία, αφού οι σπόροι αποστειρωθούν και ενοφθαλμιστούν με εναιώρημα κονιδίων μη τοξιγενούς στελέχους, επωάζονται με διέγερση, με σκοπό την αναστολή της συσσώρευσης και της σποροπαραγωγής των μυκήτων. Μετά την επώαση, τα σιτηρά ξηραίνονται σε θερμοκρασία 50° C και στη συνέχεια αποθηκεύονται στους 5° C μέχρι τη χρήση τους (Dorner, 2004).

Όταν οι σπόροι που έχουν υποστεί ζύμωση μεταφέρονται στο πεδίο, τα μη-τοξινογόνα στελέχη αυξάνονται και παράγουν πολλά κονίδια στην επιφάνεια των σπόρων. Τα κονίδια στη συνέχεια διασκορπίζονται στο έδαφος και ανταγωνίζονται τα τοξινογόνα στελέχη. Η ανάπτυξη ενός κυρίαρχου πληθυσμού ανταγωνιστικών μη τοξιγενών στελεχών, τη στιγμή που η καλλιέργεια είναι επιρρεπής στη μόλυνση από αφλατοξίνες, είναι ζωτικής σημασίας.

2.5.2 Ενοφθαλμισμός

Ο ενοφθαλμισμός είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των βιολογικών παραγόντων. Πολλά πειράματα έχουν διεξαχθεί για τον προσδιορισμό των επιδράσεων του ενοφθαλμισμού των βιολογικών παραγόντων στη μείωση της μόλυνσης από αφλατοξίνες πριν και μετά τη συγκομιδή

των φιστικιών. Στις ΗΠΑ, το 1994, όταν το μη τοξιγενές στέλεχος του *A. flavus*, NRRL21368, και εκείνο του *A. parasiticus*, NRRL6111, εφαρμόστηκαν με διαφορετικούς ρυθμούς σε καλλιέργεια φιστικιού, οι συνολικές συγκεντρώσεις αφλατοξίνης στους πυρήνες ήταν 337.6, 73.7, 34.8 και 33.3 $\mu\text{g/kg}$, για επιδράσεις με τα στελέχη σε συγκέντρωση 0, 2, 10 και 50 g/m, αντίστοιχα. Για τις ίδιες επιδράσεις, το 1995, οι συνολικές συγκεντρώσεις αφλατοξίνης στους πυρήνες ήταν 718.3, 184.4, 35.9 και 0.4 $\mu\text{g/kg}$. Σε σύγκριση με τους μάρτυρες, οι επιδράσεις με τα στελέχη σε συγκέντρωση 2, 10 και 50 g/m, οδήγησαν σε μείωση της παραγωγής αφλατοξίνης κατά 74,3%, 95,0% και 99,9%, αντίστοιχα (Dorner και συν., 1998). Τα στοιχεία δείχνουν ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του ενοφθαλμισμού και της αποτελεσματικότητας των βιολογικών παραγόντων στη μείωση της μόλυνσης από αφλατοξίνες. Επιπλέον, υψηλότερος βαθμός ελέγχου επιτεύχθηκε στο πεδίο έπειτα από επιδράσεις με βιολογικούς παράγοντες κατά τα επόμενα έτη. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν επίσης ληφθεί στην Αυστραλία (Pitt και Hocking, 2006).

Η θερμοκρασία του εδάφους μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη και τη σποροπαραγωγή του μη τοξιγενούς μύκητα σημαντικά. Ο *A. flavus* βλασταίνει σε θερμοκρασίες κάτω από 10° C σε θρεπτικό υλικό στο εργαστήριο, αλλά τα πειράματα πεδίου έδειξαν ότι τα στελέχη του βιολογικού ελέγχου δεν αναπτύχθηκαν αμέσως σε θερμοκρασία εδάφους κάτω των 20° C (Pitt και Hocking, 2006). Συμπεριλαμβανομένης της διακύμανσης των περιβαλλοντικών συνθηκών και της ποικιλίας των καλλιεργειών, ο βέλτιστος χρόνος για την εφαρμογή των μη τοξιγενών στελεχών πρέπει να βελτιστοποιείται σε κάθε περιοχή.

2.5.3 Εφαρμογή εντομοκτόνων

Τα εντομοκτόνα εφαρμόζονται συχνά στο πεδίο όπου χρησιμοποιούνται τα μη τοξινογόνα στελέχη. Ως εκ τούτου, η εφαρμογή των εντομοκτόνων μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ανάπτυξη των στελεχών αυτών.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η χρήση των εντομοκτόνων δεν έχει μακροπρόθεσμη επίδραση στους μύκητες του βιολογικού ελέγχου. Πρόσφατα διερευνήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ εντομοκτόνων και του μη τοξιγενούς στελέχους AF36. Οι Garber και Cotty (2006) αναφέρουν σε μελέτη τους ότι η παραγωγή σπορίων από το στέλεχος AF36 μειώθηκε σημαντικά όταν εκτέθηκε σε εντομοκτόνα στις συνιστώμενες συγκεντρώσεις, γεγονός το οποίο αποδεικνύει ότι τα μη τοξινογόνα στελέχη θα πρέπει να εφαρμόζονται μετά την εφαρμογή των εντομοκτόνων.

2.6 Μοριακοί μηχανισμοί της απώλειας της παραγωγής αφλατοξίνης στα μη τοξινογόνα στελέχη

Τα στελέχη *A. flavus* και *A. parasiticus* έχουν πολύπλοκα μονοπάτια βιοσύνθεσης των αφλατοξινών. Τα ένζυμα και οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες για τη σύνθεση αφλατοξίνης σε αυτούς τους δύο μύκητες κωδικοποιούνται σε περισσότερα από 25 γονίδια που συγκεντρώνονται σε μια περιοχή 70-kb (Yu και συν, 2004· Ehrlich και συν, 2005). Μεταξύ αυτών των γονιδίων, τα γονίδια *hexA*, *hexB* και *pksA* είναι μεγαλύτερα από 5 kb και κωδικοποιούν την υπομονάδα α της συνθετάσης των λιπαρών οξέων (5,8kb), την υπομονάδα β (5,1 kb), και τη συνθετάση των πολυκετιδίων (6,6 kb), αντίστοιχα. Εκτός από αυτά τα τρία γονίδια, το μέσο μέγεθος των υπόλοιπων 22 γονιδίων είναι περίπου 2 kb. Στο 5'-άκρο αυτής της αλληλουχίας DNA βρίσκεται μια ακολουθία 2 kb χωρίς αναγνωρίσιμο ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο, η οποία πιθανώς σηματοδοτεί το τέλος αυτών των γονιδίων. Στο 3'-άκρο οριοθετείται ένα καλά καθορισμένο σύμπλεγμα τεσσάρων γονιδίων (*hadA*, *hxtA*, *gleA* and *sugR*) (Yu και συν., 2004· Ehrlich και συν., 2005). Η βιοσύνθεση της αφλατοξίνης επηρεάζεται από διάφορους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ένα θετικό ρυθμιστικό γονίδιο, το *aflR*, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, η οποία προσδένεται σε συγκεκριμένη ακολουθία DNA και είναι απαραίτητη για τη μεταγραφική ενεργοποίηση των περισσότερων δομικών γονιδίων της αφλατοξίνης (Bhatnagar και συν., 2006). Εκτός από τους μεταγραφικούς παράγοντες, οι πηγές αζώτου και άνθρακα, η θερμοκρασία, το pH, το νερό και οι μεταβολίτες των φυτών επηρεάζουν σημαντικά τη σύνθεση αφλατοξινών (Ehrlich και συν., 2005· Bhatnagar και συν., 2006). Παρά το γεγονός ότι οι αφλατοξίνες συμμετέχουν στις διαδικασίες της ανάπτυξης μυκήτων και στην προστασία των μυκήτων *Aspergillus* ενάντια των μικροοργανισμών του εδάφους ή των εντόμων, δεν φαίνεται να είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των μυκήτων *Aspergillus* και την επιβίωση τους, και τα μη τοξινογόνα στελέχη είναι εξίσου ικανά να προσβάλουν ευπαθή είδη καλλιεργειών (Ehrlich και συν, 2005). Επομένως, ορισμένα από αυτά τα στελέχη μπορούν να αποκλείσουν την παραγωγή αφλατοξινών από τους φυτικούς ιστούς, μειώνοντας επομένως τη μόλυνση. Οι μοριακοί μηχανισμοί που ευθύνονται για την απώλεια της παραγωγής της αφλατοξίνης στα στελέχη του *Aspergillus spp.* έχουν μελετηθεί εκτενώς. Η ανάλυση της ακολουθίας του DNA έδειξε ότι πολλά στελέχη έχουν μια σημειακή μετάλλαξη ή έλλειψη στα γονίδια που κωδικοποιούν τις αφλατοξίνες. Η μεταβολή αυτή εισάγει ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης στην κωδική περιοχή, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες που παράγονται να αποτελούνται από λιγότερα αμινοξέα και επομένως να μην είναι

λειτουργικές, εμποδίζοντας επομένως τη συσσώρευση αφλατοξίνης (Ehrlich και Cotty, 2004).

3. ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΑ

Σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες, οι αφλατοξίνες επιβαρύνουν τρόφιμα πρώτης ανάγκης, όπως δημητριακά (κυρίως καλαμπόκι, σιτάρι και ρύζι) και τα παράγωγά τους, ελαιούχους σπόρους (βαμβάκι, αραχίδα, ελαιοκράμβη, καρύδα, ηλιοτρόπιο, κ.ά.), την κασσάβα (πρόκειται για ρίζα, πλούσια σε φυτικές ίνες και υδατάνθρακες, που αποτελεί βασική τροφή για περίπου 500 εκατομμύρια ανθρώπους στον αναπτυσσόμενο κόσμο), και διάφορους ξηρούς καρπούς.

Ο αραβόσιτος (καλαμπόκι) και η αραχίδα (αράπικο φιστίκι) είναι μείζονες πηγές ανθρώπινης έκθεσης, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας τους στη μόλυνση, και της συχνής κατανάλωσής τους σε όλα τα μήκη και πλάτη της γης.

Πιο αναλυτικά, οι αφλατοξίνες απαντώνται σε ένα μεγάλο κλάσμα των παγκόσμιων αποθεμάτων τροφίμων, στα οποία συμπεριλαμβάνονται, ο αραβόσιτος, το ρύζι, ο σόργος, το κριθάρι, η σίκαλη, το σιτάρι, η αραχίδα, η σόγια, ο βαμβακόσπορος, και άλλα παράγωγα των πρωταρχικών αυτών προϊόντων στις αναπτυσσόμενες χώρες (Rizzi και συν., 2003· Saleemullah και συν., 2006· Strosnider και συν., 2006· Masoero και συν., 2007· Caloni και Cortinovis, 2010).

Το ένα τέταρτο των παγκόσμιων καλλιεργειών τροφίμων, εκτιμάται ότι προσβάλλονται από τις αφλατοξίνες, γεγονός που δημιουργεί μεγάλη οικονομική ζημία στις αναπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες (Kumar και συν., 2008· Reddy και συν., 2008· Wagacha και Muthomi, 2008· Xu και συν., 2008). Άλλες αναφορές κάνουν λόγο για ακόμα υψηλότερο ποσοστό μόλυνσης με αφλατοξίνες (Njobeh και συν., 2009).

Ένας από τους λόγους που καθιστούν τις αφλατοξίνες μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες μυκοτοξινών, είναι το γεγονός ότι μπορούν να παραχθούν από τους αφλατοξινογόνους μύκητες, όχι μόνο πριν τη συγκομιδή, αλλά και σε στάδια μετά τη συγκομιδή, συμπεριλαμβανομένης και της αποθήκευσης. Στη συνέχεια, η έλλειψη ή κακή εφαρμογή των κανονισμών, που καθιστούν την κατανάλωση των μολυσμένων προϊόντων αναπόφευκτη, μπορεί να οδηγήσουν σε σοβαρές ασθένειες σε ανθρώπους και ζώα.

Η παρουσία των αφλατοξινών B_1 , B_2 , G_1 , και G_2 , λαμβάνει χώρα σε διαφορετικές αναλογίες, εξαρτώμενη από τον τύπο του υποστρώματος (τροφίμου). Εν τούτοις, έχει γίνει γνωστό ότι, όταν είναι παρούσες οι αφλατοξίνες B_1 και B_2 , η αναλογία (λόγος) τους είναι 1.0 προς 0.1, ενώ σε παρουσία και των τεσσάρων παραπάνω αφλατοξινών, η αναλογία τους διαμορφώνεται σε 1.0 : 0.1 : 0.3 : 0.03 (Abbas και συν., 2010· Kensler και συν., 2011). Τα δημητριακά, ιδιαίτερα το καλαμπόκι, ξηροί καρποί, όπως τα

αράπικα φιστίκια, τα φιστίκια Αιγίνης, και τα καρύδια Βραζιλίας, ελαιούχοι σπόροι, όπως ο βαμβακόσπορος, και η "copra", δηλαδή η αποξηραμένη ψίχα της καρύδας, είναι μερικά από τα προϊόντα με το μεγαλύτερο κίνδυνο μόλυνσης με αφλατοξίνες (Cornea και συν., 2011· Moghadam και Hokmabadi, 2010· Yassin και συν., 2011). Επειδή τα αράπικα φιστίκια, ο βαμβακόσπορος, και η αποξηραμένη ψίχα καρύδας αποτελούν τις κυριότερες πηγές βρώσιμων ελαίων, εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον (Idris και συν., 2010).

Στα προϊόντα που είναι ανθεκτικά ή μέτρια ευπαθή στη μόλυνση με αφλατοξίνες στον αγρό, συμπεριλαμβάνονται το σιτάρι, η βρώμη, το κεχρί, το κριθάρι, το ρύζι, η κασσάβα, η σόγια, τα φασόλια, τα όσπρια, και ο σόργος. Ωστόσο, όταν οποιοδήποτε από τα προϊόντα αυτά αποθηκευτεί κάτω από συνθήκες υψηλής υγρασίας και θερμοκρασίας, είναι πιθανή η μόλυνση με αφλατοξίνες. Άλλα προϊόντα, όπως οι κόκκοι του κακάο, οι λιναρόσποροι, τα σπόρια του πεπονιού, και οι ηλιόσποροι, μολύνονται σπάνια με αφλατοξίνες, παρουσιάζοντας μικρότερη σπουδαιότητα, σε σχέση με τα τρόφιμα που προαναφέρθηκαν (De Magalhaes και συν., 2011· Pittet, 1998).

Οι αφλατοξίνες είναι οι πιο σημαντικοί επιμολυντές στο Σύστημα Ταχείας Ειδοποίησης για τα Τρόφιμα και τις Ζωοτροφές (Rapid Alert System for Food and Feed - RASFF) της Ευρωπαϊκής Ένωσης, γεγονός που καταδεικνύεται από το ότι, για το 2008, οι ουσίες αυτές ήταν υπεύθυνες για το 30% περίπου όλων των ειδοποιήσεων (902 ειδοποιήσεις) (Energy, 2009). Με την αύξηση της γνώσης και της επίγνωσης των αφλατοξινών, ως ισχυρής πηγής κινδύνου για την υγεία, τόσο των ανθρώπων, όσο και των ζώων, έχει γίνει μεγάλη προσπάθεια για την εξάλειψή τους ή, έστω, τη μείωση της περιεκτικότητας των τροφίμων και των ζωοτροφών σε αυτές, σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα.

Παρόλο που η πρόληψη είναι η πιο αποτελεσματική παρέμβαση στο πρόβλημα, χημικές, βιολογικές, και φυσικές μέθοδοι έχουν διερευνηθεί, για την αδρανοποίηση των αφλατοξινών ή τη μείωσή τους στα τρόφιμα (Rustom, 1997).

Ο παρακάτω πίνακας (3.1) δείχνει κάποια από τα κυριότερα προϊόντα που επηρεάζονται από αφλατοξινογόνα είδη μυκήτων, σύμφωνα με μια ανασκόπηση που έγινε από τον Abidin και τους συνεργάτες του, το 2010.

Πίνακας 3.1. Κύρια προϊόντα που μολύνονται με αφλατοξίνες (Abdin και συν., 2010)

Τύπος αφλατοξίνης	Αφλατοξινογόνο είδος	Προϊόντα που μολύνονται
B (B ₁ , B ₂)	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. tamarii</i> ,	Βαμβακόσπορος, αράπικα φιστίκια, φιστικοβούτυρο,
	<i>A. pseudotamarii</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. parvisclerotigenus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. toxicarius</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. rambellii</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>A. ochraceoroseus</i> , <i>Emericella astellata</i> , <i>E. venezuelensis</i> .	μπιζέλια, σόργος, ρύζι, φιστίκια Αιγίνης (κελυφωτά), αραβόσιτος, ελαιοκράμβη, αραβοσιτάλευρο, ηλιόσπορος, σύκα, μπαχαρικά, κρέατα, γαλακτοκομικά προϊόντα, χυμοί φρούτων (μήλου, γκουάβας).
G (G ₁ , G ₂)	<i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. pseudotamarii</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>A. toxicarius</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> .	Αράπικα φιστίκια, βαμβακόσπορος, ηλιόσπορος, καρύδια, φιστίκια Αιγίνης, φιστικοβούτυρο, αραβοσιτάλευρο, μπιζέλια, δημητριακά, αραβόσιτος, σύκα, κρέατα, μπαχαρικά, γαλακτοκομικά προϊόντα, χυμοί φρούτων (μήλου, γκουάβας).

3.1 Ακατέργαστα αγροτικά προϊόντα

Η παρουσία αφλατοξινών σε ακατέργαστα αγροτικά προϊόντα ενέχει σοβαρούς κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία, αλλά και οικονομικούς κινδύνους, σε παγκόσμιο επίπεδο. Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization - FAO) εκτιμά ότι πολλά βασικά τρόφιμα είναι δυνατό να μολυνθούν με αφλατοξινογόνους μύκητες, συμβάλλοντας σε τεράστιες απώλειες, που αγγίζουν περίπου τους 1000 εκατομμύρια τόνους κάθε έτος (Bhat και συν., 2010).

Μια προσεκτική μελέτη των ετήσιων αναφορών στην τελευταία δεκαετία (2003-2009) του RASFF, έδειξε ότι τέσσερις ομάδες τροφίμων συνέβαλαν περισσότερο στη μόλυνση με αφλατοξίνες. Ωστόσο, κάποιος πρέπει να είναι πολύ προσεκτικός, πριν οδηγηθεί σε

ένα γενικότερο συμπέρασμα, καθώς τα δεδομένα αυτά εξαρτώνται από την "πολιτική" των κρατών της Ευρωπαϊκής Ένωσης, πάνω σε προϊόντα που ελέγχονται σε ποσοστό 100%, και σε εκείνα που υπόκεινται σε τυχαίο έλεγχο. Τα αποτελέσματα περιλαμβάνονται λεπτομερώς στον πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2. Σύγκριση του αριθμού των ειδοποιήσεων στο σύστημα RASFF για συγκεκριμένα προϊόντα, για τα έτη 2003-2009 (RASFF, 2011)

Έτος	Σύνολο		Ξηροί καρποί, προϊόντα τους και σπόροι		Φρούτα και λαχανικά		Προϊόντα δημητριακών		Βότανα και μπαχαρικά		Ζωοτροφές		Τροφές ζώων συντροφιάς	
	Αρ.	%	Αρ.	%	Αρ.	%	Αρ.	%	Αρ.	%	Αρ.	%	Αρ.	%
2003	763	95	695	91	33	4	6	1	5	1	-	NA	-	NA
2004	844	95	699	83	42	5	12	1	7	1	-	NA	-	NA
2005	943	95	827	88	81	9	9	1	57	6	2	0	-	NA
2006	800	91	684	86	69	9	5	1	37	5	4	1	-	NA
2007	705	93	568	81	70	10	21	3	35	5	6	1	4	1
2008	902	97	710	79	103	11	46	5	26	3	11	1	3	0
2009	638	95	517	81	64	10	13	2	23	4	9	1	11	2

Οι αφλατοξίνες παράγονται ευρέως σε γεωγραφικά πλάτη μεταξύ 40° βόρεια και 40° νότια του ισημερινού, αλλά οι μεγαλύτεροι κίνδυνοι για την υγεία εγκευμονούνται σε χώρες αναπτυσσόμενες στα τροπικά κλίματα, όπου οι ντόπιοι πληθυσμοί βασίζουν τη διατροφή τους στα προϊόντα αυτά (Strosnider και συν., 2006). Ακόμη και σε κάποια μεταποιημένα, παραδοσιακά προϊόντα, όπως η μεξικάνικη σούπα από καλαμπόκι (Mexican pozol), έχουν βρεθεί μεγάλες συγκεντρώσεις αφλατοξινών, με την αφλατοξίνη B₂ να είναι η επικρατέστερη όλων. Αυτό υποδηλώνει ότι η συγκεκριμένη αφλατοξίνη είναι πιο ανθεκτική από τη B₁, στις αλκαλικές συνθήκες που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια "σκληρών" διεργασιών, όπως είναι ο εμποτισμός και το μαγείρεμα του καλαμποκιού σε ένα αλκαλικό διάλυμα, συνήθως ασβεστόνερο (nixtamalization) (Mendez και Moreno, 2009).

Στις πλούσιες χώρες που παράγουν σιτηρά, υπάρχουν οι οικονομικοί πόροι έτσι, ώστε να διασφαλίζεται η εφαρμογή των απαραίτητων κανονισμών για τον περιορισμό της έκθεσης των αποθεμάτων τροφίμων στις αφλατοξίνες. Επιπρόσθετα, στις αγορές

σιτηρών, οι τιμές του καλαμποκιού και της αραχίδας συχνά υπαγορεύονται από την περιεκτικότητά τους σε αφλατοξίνες, κάτι που συμβάλλει στην επίτευξη χαμηλότερων επιπέδων έκθεσης στις αναπτυγμένες και πλούσιες χώρες. Έτσι, ένα αποτέλεσμα των κανονισμών και των πιέσεων της αγοράς, είναι το ότι οι ανθρώπινοι πληθυσμοί στις οικονομικά αναπτυσσόμενες χώρες εκτίθενται σε πολύ υψηλότερα επίπεδα αφλατοξινών, με τη διατροφή τους (Groorman και συν., 2008).

3.2 Σιτηρά

Το καλαμπόκι και τα αράπικα φιστίκια έχουν αναφερθεί ως μείζονες πηγές μόλυνσης με αφλατοξίνες, σε όλο τον κόσμο, και ιδιαίτερα στην Ινδία, στη Νότια Αμερική, και στην Άπω Ανατολή, στα τέλη της δεκαετίας του '90. Άλλα προϊόντα που έχουν προκαλέσει ανησυχία, λόγω της υψηλής ευαισθησίας τους στη μόλυνση με αφλατοξίνες, είναι τα τροπικά και υποτροπικά δημητριακά, οι ελαιούχοι σπόροι, και οι ξηροί καρποί, καθώς και ο βαμβακόσπορος.

Το μεγαλύτερο και πιο σοβαρό περιστατικό δηλητηρίασης από αφλατοξίνες, με επίπεδα αφλατοξινών μέχρι και 8000 µg/kg, έλαβε χώρα στην Κένυα, το 2004, προκαλώντας 125 θανάτους σε 317 κλινικά περιστατικά (Wagacha και Muthomi, 2008).

Προσεκτική μελέτη όλων των απορριφθέντων, λόγω μυκοτοξινών, παρτίδων τροφίμων (249 από τις 249), από τις 14/02/2000 έως και τις 28/04/2011, βασισμένη σε στοιχεία του RASFF, αποκάλυψε ότι τα τρίτα υψηλότερα επίπεδα αφλατοξινών παρατηρήθηκαν στην ομάδα των σιτηρών (πίνακας 3.3).

Μία βιβλιογραφική ανασκόπηση που έγινε από τους Kumar και συν., το 2008, με θέμα την επίπτωση των μυκοτοξινών σε μερικά εμπορικά σημαντικά αγροτικά προϊόντα, κατέληξε στο συμπέρασμα, ότι το καλαμπόκι είναι από τα προϊόντα με το μεγαλύτερο κίνδυνο μόλυνσης. Το καλαμπόκι είναι το καλύτερο υπόστρωμα για την ανάπτυξη αφλατοξινογόνων μυκήτων, και την παραγωγή αφλατοξινών.

Πίνακας 3.3. Μερικές από τις υψηλότερες τιμές μόλυνσης με αφλατοξίνες, σε παρτίδες σιτηρών και προϊόντων τους, που έχουν απορριφθεί (RASFF, 2011)

	Προέλευση	Προϊόν	Μέγιστα επίπεδα μόλυνσης (μg/kg)		Ημερομηνία
			B ₁	Σύνολο	
1	Ινδία	Βιολογικό καλαμποκάλευρο	410	430	08/08/2008
2	Γκάνα	Αποξηραμένο, ψημένο καλαμπόκι	336	383,6	15/10/2007
3	Ινδία	Ανάμικτοι ξηροί καρποί (mixed snacks)	184,07	188	12/12/2007
4	Ηνωμένο Βασίλειο, με πρώτη ύλη από την Γκάνα	Kenkey (προϊόν με κύριο συστατικό το καλαμπόκι)	134	153	28/04/2011
5	Γκάνα	Banku (προϊόν ζύμωσης καλαμποκάλευρου)	57	127	03/09/2010
6	Γκάνα	Καλαμποκάλευρο	56	67	04/07/2008
7	Ταϊλάνδη	Μαύρο ρύζι	52,2	72,2	01/07/2004
8	Ινδία	Καλαμποκάλευρο σε πακέτα λιανικής	47	51	06/02/2009
9	Ινδία	Αναποφλοιώτο ρύζι μπασμάτι	46,2	50,7	07/12/2007
10	Χονγκ-Κονγκ	Κέικ αυγού	45	54	01/12/2006
11	-----	Ρύζι (κόκκινο)	35,0	43,6	14/08/2001
12	Μαλαισία	Tang yuan (κολλώδεις μπάλες ρυζιού, με φιστικοβούτυρο)	35		19/03/2008
13	Καναδάς	Ψημένο αλεύρι κόκκινου ρυζιού	32	37	18/09/2009
14	Πακιστάν	Θραύσματα ρυζιού	28	32,3	15/05/2006
15	Πακιστάν	Αναποφλοιώτο ρύζι μπασμάτι	27		01/03/2007
16	Πακιστάν	Αναποφλοιώτο ρύζι μπασμάτι	22,1	23,7	13/03/2008
17	Πακιστάν	Μακρύκοκκο άσπρο ρύζι	18,9	25,6	03/03/2008
18	Πολωνία	Μακρύκοκκο άσπρο ρύζι	16,7	18,4	23/03/2007
19	Μπανγκλαντές	Νιφάδες ρυζιού	12,7	16,8	23/12/2008
20	Πακιστάν	Ρύζι μπασμάτι	12	14	27/11/2009
21	Πακιστάν	Ρύζι μπασμάτι	11,5	13	25/02/2009

Έχουν αναφερθεί υψηλά επίπεδα αφλατοξινών στο καλαμπόκι, σε αφρικανικά κράτη, και ιδιαίτερα στο Μπενίν και στο Τόνγκο, ενώ το ένα τρίτο των οικιακών σιτηρών περιείχε αφλατοξίνες, σε συγκέντρωση πενταπλάσια του ανώτερου επιτρεπτού ορίου (Wagacha και Muthomi, 2008).

Ινδοί επιστήμονες έχουν επισημάνει αρκετά περιστατικά επιδημιών αφλατοξίκωσης σε ανθρώπους, στην τελευταία δεκαετία, κυρίως λόγω της κατανάλωσης μολυσμένου σε μεγάλο βαθμό καλαμποκιού, γεγονός που καθιστά το καλαμπόκι, προϊόν υψηλού κινδύνου. Το ρύζι είναι ένα ακόμα μέλος της οικογένειας των σιτηρών, που εμφανίζει υψηλά επίπεδα μόλυνσης με αφλατοξίνες, μέχρι και 2830 $\mu\text{g/kg}$ · τιμή που, σύμφωνα με κάποιες αναφορές, ήταν ακόμα υψηλότερη από επίπεδα συγκρινόμενα με το σιτάρι και το καλαμπόκι. Η μόλυνση του ρυζιού λαμβάνει χώρα πριν τη συγκομιδή. Καθυστερημένη ξήρανση, καθώς και υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία και λανθασμένες συνθήκες αποθήκευσης, μπορεί να προκαλέσουν μόλυνση από αφλατοξίνες μετά τη συγκομιδή. Παρόλο που τόσο το άσπρο, όσο και το μισοβρασμένο (parboiled) ρύζι μπορούν να μολυνθούν με αφλατοξίνες, το τελευταίο, παρόλη τη διατροφική του αξία, λόγω της περιεκτικότητάς του σε βιταμίνη Β (η νόσος Μπέρι-Μπέρι είναι συνηθισμένη σε άτομα που τρέφονται με άσπρο ρύζι), είναι καταλληλότερο για την εισβολή των αφλατοξινογόνων μυκήτων, όταν η ξήρανση είναι ανεπαρκής (Kumar και συν., 2008).

Στην Ινδία, υψηλά επίπεδα αφλατοξίνης B_1 ανιχνεύθηκαν σε καλαμπόκι και ρύζι, που είχαν υποστεί βροχή (15600 και 1130 $\mu\text{g/kg}$, αντίστοιχα). Επίσης, υψηλά επίπεδα εντοπίστηκαν σε μισοβρασμένο (parboiled) ρύζι (μέγιστη τιμή: 130 $\mu\text{g/kg}$) (Vasanthi, 1998). Σύμφωνα με την ίδια μελέτη το 26% των δειγμάτων καλαμποκιού, ξεπέρασε το εθνικό ανώτερο επιτρεπτό όριο μόλυνσης με αφλατοξίνες, δηλαδή τα 30 $\mu\text{g/kg}$.

Τα υψηλότερα επίπεδα αφλατοξινών ανιχνεύτηκαν σε βιολογικό καλαμποκάλευρο από την Ινδία, ακολουθούμενα από ανάμικτους ξηρούς καρπούς από την ίδια χώρα, και ρύζι από την Ταϊλάνδη.

Η μόλυνση από αφλατοξίνες σε ανεπεξέργαστα και επεξεργασμένα τρόφιμα μπορεί να καταγραφεί, χρησιμοποιώντας την τεχνική της χρωματογραφίας, ή εκείνη των πλακών αντισωμάτων (Seo και συν., 2011). Η αφλατοξίνη B_1 ανιχνεύτηκε στα ακόλουθα επίπεδα, σε όλα τα δείγματα σιτηρών από τη Νιγηρία: 17,01-20,53 $\mu\text{g/kg}$ στο σιτάρι, 34,00-40,30 $\mu\text{g/kg}$ στο κεχρί, 27,22-36,13 $\mu\text{g/kg}$ στο σόργο, και 40,06-48,59 $\mu\text{g/kg}$ στο φρούτο του αρτόδενδρου (breadfruit - *Artocarpus altilis*), ενός δέντρου της οικογένειας των μουροειδών, που ευδοκimeί στη νοτιο-ανατολική Ασία και στα περισσότερα νησιά

του Ειρηνικού ωκεανού, η ονομασία του οποίου προέρχεται από την υφή του μαγειρεμένου φρούτου (γεύση πατάτας, παρόμοια με φρεσκοψημένο ψωμί) (Odoemelam και Osu, 2009).

Στο Βιετνάμ, οι Nguyen και συν. (2007) διερεύνησαν την πιθανή συνύπαρξη αφλατοξίνης B₁, κιτρινίνης, και ωχρατοξίνης. Από τα 100 δείγματα ρυζιού, που συλλέχθηκαν από όλη τη χώρα, τα 35 έδειξαν τιμές υψηλότερες από το όριο ποσοτικοποίησης (Limit Of Quantification-LOQ), του 0,22μg/kg, με ένα μέσο όρο τιμών, τα 3,31 μg/kg, και υψηλότερη τιμή, τα 29,8 μg/kg, για την αφλατοξίνη B₁. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν επίσης ένα υψηλό ποσοστό συνύπαρξης στο ρύζι, της αφλατοξίνης B₁ και της ωχρατοξίνης A. Επιπρόσθετα, η έρευνα έδειξε αξιοσημείωτη επίδραση των μουσώνων, που αύξησε το μέσο όρο των ποσοτικοποιήσιμων, ως προς την αφλατοξίνη B₁, δειγμάτων, και την αναλογία των ανιχνεύσιμων δειγμάτων στο ρύζι, σε σύγκριση με εκείνα που λήφθηκαν στην περίοδο ξηρασίας. Σε μερικές επαρχίες, οι τιμές ήταν 5 φορές υψηλότερες (μέσος όρος 10,08 μg/kg, σε σύγκριση με 1,77 μg/kg), ή ακόμα περισσότερο (μέσος όρος 4,5 μg/kg, σε σύγκριση με τιμές μικρότερες από το όριο ποσοτικοποίησης, του 0,22 μg/kg). Με δεδομένο ότι η μέση ημερήσια πρόσληψη ρυζιού από έναν ενήλικα Βιετναμέζο είναι 500 g, τα παραπάνω δεδομένα αποτελούν αφορμή για έντονο προβληματισμό (Nguyen και συν., 2007). Αναφορές προκάλεσαν ανησυχία σχετικά με την παρουσία κιτρινίνης σε ρύζι που έχει ζυμωθεί με την κόκκινη ζύμη *Monascus purpureus* (red yeast rice), μια παραδοσιακή φυσική χρωστική τροφίμων στην Ασία, ενώ -αντίθετα- δεν υπήρξαν αναφορές για αφλατοξίνες (Lin και συν., 2008). Στην Τουρκία, μια μελέτη πάνω σε δείγματα σιταριού, που δημοσιεύτηκε το 2008, αποκάλυψε ένα ποσοστό μόλυνσης 60%, σε πολύ χαμηλές τιμές (μέγιστη τιμή ήταν το 0,644 μg/kg) (Giray και συν., 2007).

Στη Βραζιλία, σε λήψη 60 δειγμάτων καλαμποκάλευρου από την αγορά του Σάο Πάολο, το 2000, δεν ανιχνεύτηκαν αφλατοξίνες (Bittencourt και συν., 2005), ενώ έρευνα της αγοράς, πάνω σε διάφορα τρόφιμα (σιτηρά και προϊόντα τους, ξηροί καρποί και προϊόντα τους, μπαχαρικά, αποξηραμένα φρούτα, και μη οينوπνευματώδη ποτά), στο Κατάρ, το 2002, είχε τα ίδια αποτελέσματα, όσον αφορά στο ρύζι και στο σιτάρι (Abdulkadar και συν., 2004).

Οι Vargas και συν. (2001), ύστερα από μια μελέτη που εκπόνησαν στη Βραζιλία, ανακοίνωσαν ότι το 38,3% των δειγμάτων καλαμποκιού ήταν μολυσμένα με αφλατοξίνη B₁, σε ένα μέσο όρο τιμής, τα 9,4 μg/kg, και μέγιστο, τα 129 μg/kg. Οι ερευνητές ανέφεραν ότι μόνο το 3,7% των δειγμάτων είχε επίπεδα ανώτερα των 20 μg/kg.

Βρήκαν, επίσης, τη συνύπαρξη της αφλατοξίνης B₁ με τη μυκοτοξίνη φουμονισίνη B₁, στο σύνολο των 82 δειγμάτων που βρέθηκαν μολυσμένα με τη συγκεκριμένη αφλατοξίνη. Η συνύπαρξη των δύο παραπάνω μυκοτοξινών με την -επίσης μυκοτοξίνη- ζεαραλενόνη, παρατηρήθηκε μόνο σε 18 δείγματα.

Στο Ιράν, η μόλυνση τροφίμων με αφλατοξίνες ανασκοπήθηκε από τον Yazdanpanah (2006). Πενήντα ένα δείγματα καλαμποκιού, από παρτίδες που προορίζονταν για ζωοτροφές και για ανθρώπινη κατανάλωση, συλλέχθηκαν από τις τέσσερις κύριες επαρχίες παραγωγής καλαμποκιού στο Ιράν, και αναλύθηκαν με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC), για μόλυνση με τις αφλατοξίνες B₁, B₂, G₁, και G₂. Η αφλατοξίνη B₁ ανιχνεύθηκε στο 58,3% και στο 80% των δειγμάτων, που λήφθηκαν από τις επαρχίες Kermanshah και Mazandaran, αντίστοιχα (Ghiasian και συν., 2011).

Σύμφωνα με μια μελέτη των Sugita-Konishi και συν. (2006), σχετικά με τη μόλυνση διάφορων τροφίμων ιαπωνικής προέλευσης με τις αφλατοξίνες B₁, B₂, G₁, και G₂, καθώς και άλλες μυκοτοξίνες, μεταξύ 2004 και 2005, οι αφλατοξίνες ανιχνεύτηκαν στα μισά, σχεδόν, δείγματα φιστικοβούτυρου, με υψηλότερη συγκέντρωση αφλατοξίνης B₁, τα 2,59 µg/kg. Αντίθετα, σε άλλα προϊόντα, όπως προϊόντα καλαμποκιού, καλαμπόκι, αράπικα φιστίκια, αλεύρι φαγόπυρου (είδος σίκαλης), αποξηραμένα λαζάνια (noodles) φαγόπυρου, ρύζι, ή σησαμέλαιο, δεν ανιχνεύτηκε μόλυνση από αφλατοξίνες.

Η παρουσία των αφλατοξινών στην τροφή, αποτελεί κίνδυνο, τόσο για τους ζωικούς οργανισμούς, όσο και για τον άνθρωπο. Αυτό συμβαίνει, γιατί, όχι μόνο τα σιτηρά (που γενικά καταναλώνονται από τους ανθρώπους), αλλά ακόμα και ολόκληρα φυτά και αγρωστώδη, από τα οποία προέρχονται, μπορούν να μολυνθούν με αφλατοξίνες. Κάτι τέτοιο αποτελεί σημαντική απειλή για τους ζωικούς πληθυσμούς, κυρίως για τα εκτρεφόμενα παραγωγικά ζώα, διότι οι ζωοτροφές που καταναλώνουν περιέχουν μεγάλες ποσότητες αφλατοξινών, ιδίως στην περίπτωση που ο αγρός ήταν μολυσμένος. Μια δυνητικά επικίνδυνη ζωοτροφή είναι το καλαμπόκι με υψηλά επίπεδα υγρασίας, εκτός εάν επεξεργαστεί με επαρκή ποσότητα συντηρητικών (π.χ. προπιονικά). Όπως έχει αναφερθεί, η υγρασία προάγει την ανάπτυξη των αφλατοξινογόνων μυκήτων, και το άλεσμα των σπόρων καταστρέφει το φυσικό φραγμό στη μόλυνση. Το άχυρο - εκτός εάν περιέχει μεγάλη ποσότητα μολυσμένων στον αγρό σιτηρών - σπάνια αποτελεί πηγή αξιόλογης ποσότητας αφλατοξινών.

Ο μύκητας για να αναπτυχθεί και να παράγει αφλατοξίνες πρέπει να αποκτήσει πρόσβαση σε ευαίσθητα μέρη του φυτού. Εποχιακές αυξήσεις στην περιεκτικότητα σε

αφλατοξίνες, παρατηρούνται, όταν τα φυτά καθίστανται πιο ευπαθή στη μυκητιακή εισβολή (κυρίως λόγω ξηρασίας ή τραυματισμού από έντομα). Ακόμα, περίοδοι που η συγκομιδή λαμβάνει χώρα κάτω από συνθήκες υγρασίας, συμβάλλουν στα υψηλά επίπεδα αφλατοξινών, σε ορισμένες καλλιέργειες. Οι αφλατοξίνες ενίοτε σχηματίζονται σε προϊόντα που έχουν αποθηκευτεί σε συνθήκες υγρασίας πάνω από 15%, καθώς και σε επαρκώς στεγνά προϊόντα, αποθηκευμένα σε εγκαταστάσεις όπου διαρρέουν ύδατα (Pier, 1992).

Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, στα σιτηρά που χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφές το ανώτατο επιτρεπτό όριο αφλατοξινών είναι τα 300 ppb, γιατί το όριο αυτό, όχι μόνο προστατεύει τα ζώα από οξεία αφλατοξίκωση, αλλά επίσης είναι αρκετά χαμηλό έτσι, ώστε να επιτρέπει τη διάθεση της μεγαλύτερης ποσότητας των καλλιεργούμενων σιτηρών. Κάτω από τέτοιες συνθήκες διατροφής των παραγωγικών ζώων, ο μακροπρόθεσμος κίνδυνος του καρκίνου δεν προκαλεί ανησυχία, εκτός από είδη που είναι πολύ ευαίσθητα. Κατά συνέπεια, η έρευνα από κτηνιατρική άποψη έχει εξετάσει υψηλότερα επίπεδα έκθεσης, αλλά για βραχύτερες χρονικές περιόδους. Η έρευνα αυτή παρέχει τις περισσότερες πληροφορίες για την τοξικότητα των αφλατοξινών σε ενδιάμεσες τιμές έκθεσης (100 – 500 ppb), και είναι δυνητικά η καταλληλότερη για την ανθρώπινη κατάσταση στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου δεν ασκείται κανένας έλεγχος για τη συγκέντρωση των αφλατοξινών στα τρόφιμα. Ωστόσο, οι διαφορές ανάμεσα στα είδη, όσον αφορά στην ανταπόκρισή τους στην έκθεση σε αφλατοξίνες, εισάγουν ένα στοιχείο προβληματισμού στην εφαρμογή πληροφοριών που συλλέγονται από τα παραγωγικά ζώα, για την εκτίμηση της ανθρώπινης κατάστασης (Williams και συν., 2004).

3.3 Ξηροί καρποί, προϊόντα τους, και σπόροι

Παράλληλα με το καλαμπόκι, στη βιβλιογραφική ανασκόπηση που έγινε από τους Kumar και συν., το 2008, με θέμα την επίπτωση των μυκοτοξινών στα εμπορικά αγροτικά προϊόντα, κύρια θέση ανάμεσα στα προϊόντα με το μεγαλύτερο κίνδυνο μόλυνσης έχει το αράπικο φιστίκι.

Στην Ινδία, το αράπικο φιστίκι είναι ανάμεσα στις καλλιέργειες με το μεγαλύτερο κίνδυνο μόλυνσης με αφλατοξίνες. Στη μελέτη του Vasanthi (1998), το 21% των δειγμάτων αράπικου φιστικιού ξεπέρασε το εθνικό ανώτερο επιτρεπτό όριο μόλυνσης με αφλατοξίνες, δηλαδή τα 30 µg/kg.

Όπως είναι ξεκάθαρο στον πίνακα 3.2, οι ξηροί καρποί, τα προϊόντα τους και οι σπόροι, είναι τα προϊόντα με τα μεγαλύτερα ποσοστά μόλυνσης. Αυτό συμβαίνει, διότι χρησιμεύουν ως πολύ καλό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των αφλατοξινογόνων μυκήτων, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε λιπαρές ουσίες. Επίσης, οι μύκητες μπορούν να παράγουν αφλατοξίνες σε όλα τα στάδια παραγωγής και διακίνησης των προϊόντων αυτών, όπως, για παράδειγμα, πριν τη συγκομιδή, κατά την ξήρανση, αλλά και κατά την αποθήκευση.

Όπως έχει προαναφερθεί, περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η παρατεταμένη ξηρασία, διαδραματίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην αύξηση του κινδύνου μόλυνσης με αφλατοξίνες (Kumar και συν., 2008). Σε παρόμοιο συμπέρασμα οδηγήθηκαν και οι Wagacha και Muthomi (2008), μελετώντας στοιχεία από την αφρικανική ήπειρο, στα οποία οι αφλατοξίνες κυριαρχούσαν στα αράπικα φιστίκια. Μια προσεκτική μελέτη όλων των απορριπτέων, λόγω μυκοτοξινών, παρτίδων προϊόντων (1000 ειδοποιήσεις, από τις 5979), που βασίστηκε σε αναρτημένες στο διαδίκτυο πληροφορίες του RASFF, από τις 16/12/2009, έως τις 02/05/2011, αποκάλυψε ότι οι ξηροί καρποί και τα προϊόντα τους κυριαρχούν ξανά στη μόλυνση με αφλατοξίνες (πίνακας 3.4).

Μια κορεατική έρευνα πάνω σε διάφορους ξηρούς καρπούς και προϊόντα τους, που διακινούνται στη Νότια Κορέα, έδειξε ότι 9 από τα 85 δείγματα, συμπεριλαμβανομένων αράπικων φιστικιών, φιστικοβούτυρου, και φιστικιών Αιγίνης, ήταν μολυσμένα με αφλατοξίνες, δηλαδή ποσοστό 10,6 %. Η πιο μολυσμένη κατηγορία ήταν τα αράπικα φιστίκια (ψημένα), με τιμές που κυμάνθηκαν μεταξύ 2,00 και 28,24 $\mu\text{g/kg}$, και ένα μέσο όρο $10,67 \pm 12,30 \mu\text{g/kg}$ για το σύνολο των αφλατοξινών ($7,97 \pm 7,75 \mu\text{g/kg}$ για την αφλατοξίνη B₁). Παρόμοια δεδομένα, με ελαφρά χαμηλότερες τιμές αφλατοξινών, βρέθηκαν σε 1 δείγμα ανάμικτων ξηρών καρπών και 2 δείγματα φιστικοβούτυρου (Chun και συν., 2007). Σε μια τουρκική έρευνα, που διεξήχθη από το Σεπτέμβριο του 2008, έως το Φεβρουάριο του 2009, ανιχνεύθηκε μόλυνση με αφλατοξίνη B₁, σε ποσοστό σχεδόν 49,2 % (59/120) των χύμα και συσκευασμένων δειγμάτων φιστικιών Αιγίνης, σε επίπεδα -όμως- χαμηλότερα του ανώτερου επιτρεπτού των 5 $\mu\text{g/kg}$ (Set και Erkmen, 2010). Οι Abdulkadar και συν. (2004) βρήκαν μόλυνση από αφλατοξίνη B₁ σε διαφορετικούς ξηρούς καρπούς, σε ένα εύρος τιμών, από μη ανιχνεύσιμες έως και 81,64 $\mu\text{g/kg}$, ενώ σε μια μελέτη από τους Ismail και συν. (2010), πάνω σε 196 ξηρούς καρπούς και τα προϊόντα τους στη Μαλαισία, ποσοστό 16,3% των προϊόντων έδειξε μόλυνση από αφλατοξίνες, με τιμές μεταξύ 17,2 και 350 $\mu\text{g/kg}$.

Στην Ελλάδα, μελέτη για την παρουσία αφλατοξινών στα φιστίκια, το 2008, έδειξε ότι μόνο το 5% των υγιών καρπών βρέθηκαν θετικοί στην αφλατοξίνη, ενώ το 30% των προσβεβλημένων στο σπέρμα - από έντομα - καρπών και το 70% με καφέ-μαύρο σπέρμα ήταν θετικοί στην αφλατοξίνη. Συνδέθηκε, λοιπόν, η ύπαρξη αφλατοξίνης με την προσβολή από έντομα, ενώ βρέθηκε τάση για μόλυνση σε καρπούς που αποξηράθηκαν στον ήλιο (Voyatzidaki και συν., 2008).

Η Georgiadiou (2009) μελετώντας την παρουσία αφλατοξινών στα φιστίκια σε σχέση με τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, βρήκε παρόμοια αποτελέσματα και συμπεράσματα όπως:

- το κρίσιμότερο στάδιο μόλυνσης του καρπού είναι αυτό της ωρίμανσης
- κατά τη συγκομιδή ο καρπός είναι επιβαρυνμένος περισσότερο από κάθε άλλη παραγωγική φάση
- η αφλατοξίνη B₁ είναι η κύρια αφλατοξίνη των φιστικιών
- οι προβληματικοί ή προσβεβλημένοι από έντομα καρποί έχουν και μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης αφλατοξίνης
- υπάρχει πιθανότητα επιμόλυνσης των υγιών καρπών από τους μολυσμένους
- στο στάδιο της ξήρανσης σε αποξηραντήρα, η συγκέντρωση των αφλατοξινών μειώνεται· κάτι όμως που δε συμβαίνει κατά την αποξήρανση στον ήλιο
- η αποθήκευση θα πρέπει να γίνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, και όχι σε θερμοκρασία δωματίου, η οποία αυξάνει τις υπάρχουσες συγκεντρώσεις αφλατοξίνης.

Πίνακας 3.4. Μερικές από τις υψηλότερες τιμές μόλυνσης με αφλατοξίνες, σε παρτίδες ξηρών καρπών, προϊόντων τους, και σπόρων, που έχουν απορριφθεί (RASFF, 2011)

	Προέλευση	Προϊόν	Μέγιστα επίπεδα μόλυνσης (μg/kg)		Ημερομηνία
			B ₁	Σύνολο	
1	Ηνωμένες Πολιτείες	Αμύγδαλα	43800	47800	13/04/2010
2	Ιταλία, με πρώτη ύλη από το Αφγανιστάν	Φιστίκια Αιγίνης (ψημένα)	973	-----	22/07/2010
3	Γεωργία	Φουντούκια (ψίχα)	638	713	24/03/2011
4	Γκάνα	Πάστα αράπικων φιστικιών	622	810	25/10/2010
5	Αίγυπτος	Αράπικα φιστίκια με κέλυφος	614,0	646,4	07/12/2010
6	Τουρκία	Φιστίκια Αιγίνης	594	665	25/11/2010
7	Ιράν	Φιστίκια Αιγίνης	562	597,7	30/04/2010
8	Συρία	Φιστίκια Αιγίνης (ψίχα)	333	369	29/03/2011
9	Αλγερία	Κουκούτσια αποξηραμένων βερύκοκων	333	342,5	16/12/2009
10	Ιράν	Φιστίκια Αιγίνης	210	230	21/03/2011
11	Κίνα	Αράπικα φιστίκια με κέλυφος	192	214	24/03/2010
12	Ιταλία	Αποξηραμένες νιφάδες κάστανου	184		26/11/2010
13	Νιγηρία	Σπόροι πεπονιού	136,3	154,1	03/02/2011
14	Ηνωμένες Πολιτείες	Ωμά φιστίκια Αιγίνης	120	134	18/03/2010
15	Ινδία	Αράπικα φιστίκια (ψίχα)	118,0	281,0	15/04/2011
16	Ηνωμένες Πολιτείες	Αλατισμένα αμύγδαλα	95,1	127,3	04/02/2010
17	Ηνωμένες Πολιτείες	Αμύγδαλα	61,5	69,2	12/11/2010
18	Ουκρανία	Καρύδια	38		08.02/2011

3.4 Φρούτα και λαχανικά

Η προσεκτική μελέτη όλων των απορριφθέντων παρτίδων, λόγω μυκοτοξινών (277 από τις 672), από την 01/01/2008 έως τις 19/04/2011, σύμφωνα με στοιχεία του RASFF, αποκάλυψε ότι τα υψηλότερα επίπεδα αφλατοξινών βρέθηκαν σε αποξηραμένα σύκα τούρκικης προέλευσης, ακολουθούμενα από αποξηραμένα σύκα ελληνικής προέλευσης (πίνακας 3.5).

Η επιμόλυνση των φρούτων με αφλατοξίνες έγινε ευρύτερα γνωστή στα τελευταία χρόνια. Αναφορές έχουν δείξει ότι τα σύκα, οι χουρμάδες, και τα εσπεριδοειδή, που καλλιεργούνται σε ευπαθείς περιοχές (συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών), μπορούν να μολυνθούν με αφλατοξίνες (Rivka Barkai-Golan, 2008), με τα σύκα να είναι πιο ευάλωτα στη μόλυνση. Το αίτιο για τις υψηλές αυτές ευαισθησίες, εκτός από τις χημικές ιδιότητές τους, είναι ότι ο μύκητας *A. flavus* έχει την ικανότητα να εισέρχεται και να αποικίζει το εσωτερικό του φρούτου (Rivka Barkai-Golan, 2008). Παρόλο που μερικές έρευνες βρήκαν μόνο ίχνη αφλατοξινών σε σύκα (Blesa και συν., 2004), σε άλλες βρέθηκαν αρκετά υψηλά επίπεδα, ενώ τα επίπεδα μόλυνσης μπορούν να φτάσουν μέχρι και στα 77,2 ng/g (Doster και συν., 1996). Μόλυνση με αφλατοξίνες έχει αναφερθεί επίσης, αλλά σε μικρότερο βαθμό, και σε άλλα φρούτα, όπως είναι οι χουρμάδες, και τα εσπεριδοειδή, καθώς και σε σταφίδες και ελιές (El Adlouni και συν., 2006· Ferracane και συν., 2007· Shenasi και συν., 2002). Στην περίπτωση των εσπεριδοειδών, τουλάχιστον, υπάρχουν σαφείς αποδείξεις δυνητικού κινδύνου μόλυνσης με αφλατοξίνες (Bamba και Sumbali, 2005).

Επίσης, στην πλειοψηφία των δειγμάτων αποξηραμένων τσιπ γλυκοπατάτας, που λήφθηκαν στο Μπενίν, η αφλατοξίνη B₁ ανιχνεύτηκε σε επίπεδα που ανήλθαν στα 220 μg/kg, παρόλο που ο μέσος όρος ήταν πολύ χαμηλότερος (14 μg/kg). Στη Νιγηρία, το 54% των δειγμάτων αποξηραμένων τσιπ γλυκοπατάτας βρέθηκε θετικό στη μόλυνση με αφλατοξίνες, ενώ σε περισσότερο από το ένα τρίτο των δειγμάτων του ξηρού καρπού tiger nut (*Cyperus esculentus*) ανιχνεύτηκαν υψηλά επίπεδα αφλατοξινών (από 10 έως και 120 μg/kg) (Bankole και Mabekoje, 2004).

Πίνακας 3.5. Μερικές από τις υψηλότερες τιμές μόλυνσης με αφλατοξίνες, σε παρτίδες φρούτων και λαχανικών, που έχουν απορριφθεί (RASFF, 2011)

Προέλευση		Προϊόν	Μέγιστα επίπεδα μόλυνσης (μg/kg)		Ημερομηνία
			AFB₁	Σύνολο	
1	Τουρκία	Αποξηραμένα σύκα	91,1	133,4	04/07/2008
2	Τουρκία	Αποξηραμένα σύκα	76	84	18/01/2008
3	Ελλάδα	Αποξηραμένα σύκα	70,6	76,4	22/12/2010
4	Τουρκία	Αποξηραμένα σύκα	63,5	117,5	03/01/2008
5	Ουγγαρία, με πρώτη ύλη από την Τουρκία	Αποξηραμένα σύκα	62,2	104,2	22/12/2008
6	Τουρκία	Αποξηραμένα σύκα	55	113	26/11/2010
7	Τουρκία	Αποξηραμένα σύκα	54,2	58,3	20/10/2010
8	Ελλάδα	Λιαστά σύκα	47,9	86,7	03/12/2009
9	Τουρκία	Αποξηραμένα σύκα	41,8	51,23	19/11/2008
10	Τουρκία	Αποξηραμένα σύκα	25,0	36,25	17/01/2008

3.5 Βότανα και μπαχαρικά

Τα φαρμακευτικά φυτά είναι διάφορα φυτά με φαρμακευτικές ιδιότητες, που αποτέλεσαν τον πυρήνα της παραδοσιακής θεραπείας στο μεγαλύτερο μέρος της ανθρώπινης ιστορίας. Παρ' όλο που οι τοξικές επιδράσεις μερικών ήταν γνωστές για αιώνες, μόνο πρόσφατα η ασφάλειά τους, έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας.

Σήμερα, στα φυτικά φάρμακα, ένα από τα θέματα ασφάλειας είναι η παρουσία μυκοτοξινών, ιδιαίτερα αφλατοξινών, καθώς η χρήση τους στη σύγχρονη εποχή έχει αυξηθεί, ύστερα από ύφεση που είχε διάρκεια σχεδόν έναν αιώνα. Έχει αναφερθεί ότι μπαχαρικά και βότανα, που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση κάποιων ηπατικών διαταραχών, μπορεί να είναι μολυσμένα με υψηλές συγκεντρώσεις αφλατοξινών· κυρίως αφλατοξίνης B₁ στην αρκετά υψηλή τιμή των 2230 μg/kg (Moss, 1998). Οι Abdulkadar και συν. (2004) αναφέρουν ότι σε μείγμα μπαχαρικών που διατίθεται στη

μορφή σκόνης ανίχνευσαν αφλατοξίνη B₁, οι τιμές της οποίας κυμαίνονταν από 0,16-5,12 μg/kg, ενώ σε σκόνη λευκού τσίλι οι τιμές της κυμαίνονταν από 5,60-69,28 μg/kg. Σε μια μελέτη, που έλαβε χώρα στην Τουρκία και διεξήχθη για το διάστημα από το Σεπτέμβριο του 2008 έως το Φεβρουάριο του 2009, παρατηρήθηκε ότι στο 80% (48/60) των χύμα και συσκευασμένων δειγμάτων πάπρικας, ανιχνεύτηκαν επίπεδα αφλατοξίνης B₁ οι τιμές των οποίων κυμαίνονταν από 5-55,9 μg/kg (Set και Erkmen, 2010). Οι Zinedine και συν. (2006) αναφέρουν σχετικά χαμηλά επίπεδα αφλατοξινών σε δείγματα μπαχαρικών, όπως πάπρικα, πιπερόριζα (τζίντζερ), κύμινο, και πιπέρι, με το υψηλότερο επίπεδο αφλατοξινών να εμφανίζεται στην κόκκινη πάπρικα (9,68 μg/kg).

Λεπτομερής μελέτη όλων των απορριφθέντων, λόγω μυκοτοξινών, παρτίδων μπαχαρικών (211 από τις 432), από τις 06/12/2001 έως τις 19/04/2011, βασισμένη σε στοιχεία του RASFF, αποκάλυψε ότι τα υψηλότερα επίπεδα αφλατοξινών υπήρχαν σε σκόνη κάρυ από τη Νιγηρία, σε ολόκληρα μοσχοκάρυδα από την Ινδονησία, σε αποξηραμένη πάπρικα από το Περού, και σε ένα μείγμα πιπεριού για κεμπάπ (suya pepper) από την Γκάνα, ακολουθούμενα από σκόνη πάπρικας από το Ηνωμένο Βασίλειο (πίνακας 3.6). Σε αντίθεση με τη μακριά ιστορία και την ευρεία χρήση των φυτικών φαρμάκων, λίγες είναι οι δημοσιεύσεις σχετικά με τη μόλυνσή τους με αφλατοξίνες, σε σύγκριση με το μεγάλο αριθμό δημοσιεύσεων για τη μόλυνση των σιτηρών και των ελαιούχων σπόρων με τις μυκοτοξίνες αυτές (Trucksess και Scott, 2008). Ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (European Pharmacopoeia Commission) έχει θέσει ως όρια για τη συγκέντρωση της αφλατοξίνης B₁ και του συνόλου των αφλατοξινών στα φαρμακευτικά φυτά, τα 2 και 4 μg/kg, αντίστοιχα (Pharmacopoeia, 2007).

Παρ' όλο που σε μια μελέτη στη Νότια Αφρική δεν ανιχνεύτηκε μόλυνση με αφλατοξίνες σε κάποια φαρμακευτικά φυτά (Sewram και συν., 2006), σε άλλες εντοπίστηκαν αφλατοξίνες, σε τιμές, από 2,90 έως 32,18 μg/kg (Yang και συν., 2005). Οι Roy και συν. (1988), σε μελέτη που διεξήγαγαν στην Ινδία, παρατήρησαν τόσο υψηλή επίπτωση (>93%), όσο και υψηλά επίπεδα τιμών για τις αφλατοξίνες, που κυμαίνονταν μεταξύ 90 και 1200 μg/kg, για κάποια κοινά φαρμακευτικά φυτά. Το φυτό *Piper nigrum*, με μια συγκέντρωση αφλατοξίνης B₁, 1200 μg/kg, είχε το υψηλότερο επίπεδο μόλυνσης. Η δεύτερη υψηλότερη τιμή που αναφέρθηκε, ήταν στους σπόρους του φυτού *Mucuna prurita*, και ανερχόταν στα 1160 μg/kg, ενώ η τρίτη, τα 1130 μg/kg, βρέθηκε στις ρίζες του φυτού *Plumbago zeylanica*. Αφλατοξίνες (500 μg/kg) ανιχνεύτηκαν μόνο σε 1 από τα 5 δείγματα του φαρμακευτικού φυτού *Aerva lanata*, στη Σρι Λάνκα (Abeywickrama και Bean, 1991). Σε άλλη έρευνα, στην Ινδία, το 60% των

δειγμάτων από σπόρους φαρμακευτικών φυτών ήταν μολυσμένο με αφλατοξίνη B₁, με τιμές που κυμαίνονταν από 20 μέχρι και 1180 μg/kg (Trucksess και Scott, 2008). Στην Ταϊλάνδη, 5 από τα 28 φυτικά φαρμακευτικά προϊόντα βρέθηκαν μολυσμένα με αφλατοξίνες, σε τιμές μεταξύ 1,7 και 14,3 μg/kg, με τη χρήση της τεχνικής των Στηλών Ανοσο-συγγένειας (Immuno-Affinity Columns - IAC), και της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography- HPLC) (Tassaneeyakul και συν., 2004). Κανένα από τα δείγματα δεν περιείχε αφλατοξίνες σε επίπεδα υψηλότερα των 20 ng/g. Στη Μαλαισία και στην Ινδονησία, 16 από τα 23 διακινούμενα στο εμπόριο παραδοσιακά φυτικά φαρμακευτικά προϊόντα (jamu και makjun), που αναλύθηκαν με τις μεθόδους IAC/LC, περιείχαν χαμηλές συγκεντρώσεις συνολικών αφλατοξινών (0,36 μg/kg) (Ali και συν., 2005). Οι Romagnoli και συν. (2007) εξέτασαν 27 αρωματικά βότανα, 48 φυτικά αφεψήματα και φαρμακευτικά φυτά, συνδυάζοντας την Υγρή Χρωματογραφία (LC) με την ανίχνευση μέσω φθορισμού, και δεν εντόπισαν μόλυνση με αφλατοξίνες. Οι Hitokoto και συν., (1978) αναφέρουν ότι μελέτησαν 49 κονιοποιημένα φυτικά φάρμακα και δεν εντόπισαν αφλατοξίνες, ενώ σε άλλη μελέτη, στην Αργεντινή, το 10% των δισκίων του *Cascara sagrada*, που χρησιμοποιείται ως καθαρτικό, ήταν μολυσμένο (Trucksess και Scott, 2008).

Σε μελέτη πάνω σε δείγματα σκόρδου, δεν ανιχνεύτηκαν αφλατοξίνες σε επίπεδα ανώτερα του 0,1 μg/kg. Ωστόσο, η πιπερόριζα βρέθηκε μολυσμένη, με τιμές ανάμεσα στα 4,2 και 13,5 μg/kg (Patel και συν., 1996).

Στο Ηνωμένο Βασίλειο έλαβε χώρα μελέτη, με αντικείμενο τη μόλυνση με αφλατοξίνες κάποιων βοτάνων και μπαχαρικών, όπως είναι η σκόνη κάρυ, το πιπέρι, το πιπέρι καγιέν, οι πιπεριές τσίλι, η πάπρικα, η πιπερόριζα, η κανέλα, και το κόλιανδρο. Η μελέτη έδειξε ότι το 95% των δειγμάτων ήταν μολυσμένο από αφλατοξίνες, με τις κατώτερες τιμές να ανέρχονται στα 10 μg/kg, ενώ μόνο τα 9 από τα 157 δείγματα λιανεμπορίου είχαν υψηλότερα επίπεδα (MacDonald και Castle, 1996). Σε μελέτη δειγμάτων ριζών του φυτού τζίνσενγκ (άγριων και καλλιεργηθέντων), που -ως φαρμακευτικό προϊόν- αποτελεί αποξηραμένη ρίζα του φυτού *Panax Ginseng*, και χρησιμοποιείται ως συστατικό θεραπευτικών σκευασμάτων εδώ και εκατοντάδες χρόνια στην Κίνα, την Ιαπωνία και την Κορέα, βρέθηκαν περίπου 15 μg/kg συνολικών αφλατοξινών, μόνο σε 2 από τις άγριες ρίζες. Αντίθετα, καμία από τις καλλιεργηθέντες ρίζες δεν ήταν μολυσμένη με αφλατοξίνες. Παρόμοια αποτελέσματα (16 μg/kg) βρέθηκαν σε μία μόνο μουχλιασμένη ρίζα, που λήφθηκε από ένα παντοπωλείο (D' Ovidio και συν., 2006). Οι Trucksess και Scott (2008) βρήκαν ότι το 30% των

προϊόντων τζίνσενγκ που είχαν αγοραστεί στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, ήταν μολυσμένες με αφλατοξίνη B₁, σε τιμές περίπου 0,1 µg/kg. Τέλος, σε μια έρευνα για τις αφλατοξίνες, που έλαβε χώρα στην Τουρκία, το 17,1% και το 23,1% των χύμα και πακεταρισμένων δειγμάτων πάπρικας, αντίστοιχα, ήταν μολυσμένο με αφλατοξίνη B₁, με το ένα από τα 82 συνολικά δείγματα να ξεπερνά το ανώτατο επιτρεπτό όριο (Set και Erkmen, 2010).

Πίνακας 3.6. Μερικές από τις υψηλότερες τιμές μόλυνσης με αφλατοξίνες, σε παρτίδες βοτάνων και μπαχαρικών, που έχουν απορριφθεί (RASFF, 2011)

	Προέλευση	Προϊόν	Μέγιστα επίπεδα μόλυνσης (µg/kg)		Ημερομηνία
			B ₁	Σύνολο	
1	Ινδία	Κουρκούμη τριμμένη και ολόκληρο μοσχοκάρυδο	700	1200	18/10/2010
2	Νιγηρία	Σκόνη κάρυ	570	1100	03/09/2008
3	Ινδονησία	Ολόκληρο μοσχοκάρυδο	384,5	455,3	20/12/2007
4	Ινδία	Μοσχοκάρυδο τριμμένο και σπασμένο	230	249	03/09/2008
5	Περου	Αποξηραμένη πάπρικα	216	221	23/12/2009
6	Γκάνα	Μείγμα πιπεριού για κεμπάπ (suya pepper)	169	215,9	04/01/2008
7	Ισπανία	Σκόνη πάπρικας	145,3	160,8	10/08/2010
8	Ηνωμένο Βασίλειο, με πρώτη ύλη από Ισπανία	Σκόνη πάπρικας	120,3	135	11/2010
9	Ινδονησία	Μοσχοκάρυδο	120	140	03/12/2009
10	Ισπανία	Μοσχοκάρυδο	98	105	04/04/2011
11	Ινδία	Σκόνη μοσχοκάρυδου	79+/-24	97+/-29	21/01/2010
12	Ινδονησία	Μοσχοκάρυδο	57		26/10/2010
13	Ινδονησία	Τριμμένο μοσχοκάρυδο	56	70,5	19/08/2010
14	Ινδία	Τριμμένο μοσχοκάρυδο	50	58,2	27/04/2010
15	Ινδία	Σκόνη κουρκούμης	48	53	24/12/2010
16	Ινδία	Σκόνη κουρκούμης	48	52	29/04/2009
17	Ινδία	Σκόνη τσίλι	47,2	48,7	05/11/2010
18	Ινδία	Τριμμένο μοσχοκάρυδο (βιολογικό)	41,1		28/05/2010
19	Ινδία	Θρυμματισμένες πιπεριές τσίλι (μπούκοβο)	38	40	27/08/2010
20	Πακιστάν	Σκόνη τσίλι	30,3	32,1	16/08/2010
21	Ινδία	Σκόνη σκόρδου		29	17/02/2009
22	Ινδία	Σκόνη κάρυ	26,4	27,4	14/07/2010
23	Ινδία	Σκόνη τσίλι	24	25	31/08/2010

24	Ινδία	Αποξηραμένο κόκκινο τσίλι	23	25	17/12/2010
25	Κίνα	Σκόνη κόκκινου πιπεριού	22	26	09/07/2010
26	Ινδία	Αποξηραμένες ολόκληρες πιπεριές τσίλι	20	21	24/11/2010
27	Ινδία	Πιπερόριζα (τζίντζερ)	13,2	24	19/04/2011

3.6 Ζωοτροφές

Η μόλυνση των ζωοτροφών με αφλατοξίνες εγκυμονεί κινδύνους για την υγεία των ζώων, και έμμεσα του ανθρώπου, με την κατανάλωση προϊόντων ζωικής προέλευσης. Αποτελεί σημαντικό ζήτημα για τους κτηνοτρόφους, λόγω της οξείας, αλλά και της χρόνιας τοξικότητας που προκαλείται στα παραγωγικά ζώα, με οικονομικό αντίκτυπο που περιλαμβάνει τη μείωση της παραγωγικότητας (μείωση ρυθμού ανάπτυξης, προβλήματα στην αναπαραγωγή, κ.ά.) και βλάβες ζωτικών οργάνων (Upadhaya και συν., 2010). Ζωοτροφές, όπως είναι ο σανός και το άχυρο, μπορεί να μολυνθούν με αφλατοξίνες πριν τη συγκομιδή, ή κατά τα στάδια ξήρανσης (Bhat και συν., 2010).

Οι μολυσμένες με αφλατοξίνες ζωοτροφές έχουν σημαντικές επιπτώσεις στα μονογαστρικά ζώα. Τα μηρυκαστικά είναι πιο ανθεκτικά, λόγω της ικανότητας της μικροβιακής χλωρίδας της μεγάλης κοιλίας να βιο-μετατρέπει τις αφλατοξίνες. Άλλοι παράγοντες, όπως είναι η ηλικία, η συγκέντρωση των αφλατοξινών, και η διάρκεια της έκθεσης στις ουσίες αυτές, μπορούν να διαδραματίσουν κάποιο ρόλο (Rustemeyer και συν., 2010· Upadhaya και συν., 2010).

Στα μηρυκαστικά, ένα μέρος της αφλατοξίνης B₁ υποβαθμίζεται σε αφλατοξικόλη, και το υπόλοιπο υδροξυλιώνεται στο ήπαρ σε αφλατοξίνη M₁ (Upadhaya και συν., 2010). Η αφλατοξίνη B₁ θεωρείται ως καρκινογόνο ομάδας I για τον άνθρωπο, σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό για την Έρευνα στον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer - IARC) (Seo και συν., 2011). Η αφλατοξίκωση μπορεί να προκαλέσει θάνατο στα μηρυκαστικά (Pierezan και συν., 2010). Παρόλη την εκτεταμένη έρευνα κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, η οποία βοήθησε τις αρχές, σε παγκόσμιο επίπεδο, να θεσπίσουν μέτρα ελέγχου, η μόλυνση με αφλατοξίνες των τροφίμων, αλλά και των αγροτικών προϊόντων, παραμένει ένα από τα πιο σημαντικά προβλήματα για την ασφάλεια των τροφίμων.

Μόλυνση με αφλατοξίνες έχει ανιχνευθεί σε περισσότερα από το 60% των δειγμάτων ζωοτροφών, στο Χαρτούμ του Σουδάν, με μια μέση συγκέντρωση, τα 130,63 µg/kg. Η

πιο συνηθισμένη αφλατοξίνη ήταν η B₁ (Elzuripir και συν., 2009). Σε μια μελέτη που έγινε στην Κολομβία, από τους Diaz και συν. (2009), περισσότερα από το 50% των δειγμάτων ζωοτροφών ήταν μολυσμένο με μύκητες του γένους *Aspergillus*. Το καλαμπόκι (100%), ο βαμβακόσπορος (80%), ο σόργος (60%), και τα πίτουρα σιταριού (60%), παρουσίασαν τα υψηλότερα επίπεδα μόλυνσης. Το εύρος της μόλυνσης με αφλατοξίνη B₁ κυμαίνονταν από 0,2 - 240,4 μg/kg. Στη χώρα του Κουβέιτ, 84 δείγματα ζωοτροφών έδειξαν ποσοστό μόλυνσης με συνολικές αφλατοξίνες, περίπου 80% (Dashti και συν., 2009), ενώ στο Λίβανο, σε μελέτη που διενεργήθηκε σε χρονικό διάστημα ενός έτους, πάνω σε δείγματα από φορτία καλαμποκιού που παραλήφθηκαν από τέσσερις μεγάλες εταιρίες ζωοτροφών, το 14% είχαν περιεκτικότητα σε αφλατοξίνη B₁, μεταξύ 6 και 30 μg/kg (Barbour και συν., 2008). Σε μελέτη που έλαβε χώρα στο Βιετνάμ παρατηρήθηκε ότι η μόλυνση του καλαμποκιού σε δείγματα που προορίζονταν για ανθρώπινη κατανάλωση, παρ' ότι ήταν συχνή (77%), χαρακτηριζόταν από χαμηλότερα επίπεδα μόλυνσης με αφλατοξίνη B₁, σε σύγκριση με δείγματα ζωοτροφών (Trung και συν., 2008). Στη Βραζιλία, η αφλατοξίνη B₁ ανιχνεύτηκε στο 42% των δειγμάτων ζωοτροφών, που λήφθηκαν από μονάδες γαλακτοπαραγωγής, για το χρονικό διάστημα από τον Οκτώβριο του 2005, έως και το Φεβρουάριο του 2006. Οι τιμές που βρέθηκαν κυμαίνονταν από 1,0 μέχρι και 26,4 μg/kg, με ένα μέσο όρο της τάξης των $7,1 \pm 7,2$ μg/kg (Oliveira και συν., 2008). Ωστόσο, τα επίπεδα αφλατοξινών που ανιχνεύτηκαν στη Νότια Αφρική, σε ζωοτροφές όπως το καλαμπόκι, το σιτάρι, ο ηλιόσπορος, ο βαμβακόσπορος, τα πίτυρα σιταριού, η γλουτένη, και τροφές κατοικίδιων, κυμάνθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα ($0,8 \pm 0,2$ μg/kg) (Odhan και συν., 2008). Σε άλλη μελέτη, στη Βραζιλία, τροφή για αίγες βρέθηκε μολυσμένη με αφλατοξίνη B₁ σε ποσοστό 44%, με τιμές, από 2,4 έως 8,7 μg/kg (Keller και συν., 2008), ενώ στη νότια Αιθιοπία, το καλαμπόκι περιείχε τη συγκεκριμένη μυκοτοξίνη, σε τιμή 22,72 μg/kg (Alemu και συν., 2008). Ακόμα, μελέτη πάνω στη σύνθεση και τη θρεπτική επάρκεια έξι εμπορικών συσκευασιών τροφής για κατοικίδια κουνέλια, έδειξε 11,36 μg/kg περιεκτικότητα σε αφλατοξίνη B₁, δηλαδή ελαφρά υψηλότερη από το ανώτατο όριο των 10 μg/kg που έχει θεσπίσει η Ευρωπαϊκή Ένωση (Ricci και συν., 2010).

Η εποχιακή διακύμανση της μόλυνσης με αφλατοξίνες μπορεί να ποικίλλει, ανάλογα με τον τύπο ζωοτροφής, την επεξεργασία, και τις συνθήκες αποθήκευσης. Για παράδειγμα, οι Tajkarimi και συν. (2008) απέδειξαν ότι η μόλυνση με αφλατοξίνες είναι μεγαλύτερη το χειμώνα. Στην Ιαπωνία, αποδείχτηκε και από άλλους ερευνητές, ότι σε δείγματα καλαμποκιού ο υψηλότερος βαθμός μόλυνσης παρατηρήθηκε κατά τη χειμερινή περίοδο

(Sugita-Konishi και συν., 2006). Ωστόσο, έρευνα που διενεργήθηκε στο Σουδάν, από τους Elzurir και συν. (2010), πάνω σε ζωοτροφές, όπως οι αραχίδες, τα πίτυρα σιταριού, ο σόργος, καθώς και προκατασκευασμένα σιτηρέσια, κατέληξε στο αντίθετο συμπέρασμα. Η υψηλότερη μόλυνση έλαβε χώρα το καλοκαίρι (78,95% των δειγμάτων), ακολουθούμενη από το φθινόπωρο (66,67%), ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα παρατηρήθηκαν το χειμώνα (47,37%).

Η πρόωπη συγκομιδή, η σωστή ξήρανση, η υγιεινή, η ορθή αποθήκευση, και η καταπολέμηση των εντόμων, είναι παράμετροι που συμβάλλουν στον έλεγχο της μόλυνσης με αφλατοξίνες (Wagacha και Muthomi, 2008).

Υπάρχουν τρεις δυνατότητες, για να αποφευχθούν οι επιβλαβείς συνέπειες της μόλυνσης των ζωοτροφών με αφλατοξίνες. Αυτές είναι, η πρόληψη της μόλυνσης, η απολύμανση των μολυσμένων ζωοτροφών, και η παρεμπόδιση της απορρόφησης των επικίνδυνων αυτών μυκοτοξινών στην πεπτική οδό (Halasz και συν., 2009).

Η άμεση και έμμεση επίδραση της αμμωνίας μπορεί να μειώσει τα επίπεδα των αφλατοξινών, όπως αποδείχτηκε σε έρευνα που έγινε σε κρεοπαραγωγά ορνίθια που σιτίζονταν με μολυσμένο με αφλατοξίνη B₁ καλαμπόκι (Tajkarimi και συν., 2008). Ακόμα, έχει αποδειχτεί, ότι βιταμίνες, όπως η A, και προβιταμίνες, όπως το καροτένιο και τα καροτενοειδή, φαινολικές ενώσεις, κουρκουμινοειδή, και θειούχες ενώσεις, όπως η γλουταθειόνη και η γλυκομανάνη, είναι ικανές να εμφανίσουν αντιοξειδωτική δράση απέναντι στην τοξίκωση από αφλατοξίνη B₁, αλλά και σε άλλες μυκοτοξινώσεις (Donmez και Keskin, 2008· Gowda και Ledoux, 2008). Το κιτρικό οξύ έχει επιτυχώς χρησιμοποιηθεί, για να μειώσει το επίπεδο των αφλατοξινών B₁ και B₂ στο σόργο, από 17 μέχρι και 92%, διατηρώντας το χρώμα, το ιξώδες, τις λειτουργικές ιδιότητες και την υφή του προϊόντος, σε αποδεκτά όρια (Mendez-Albores και συν., 2009). Η χρήση υψηλής ποιότητας νατριούχου μπεντονίτη (High Grade Sodium Bentonite - HGSB), που αποτελεί αργιλοπυριτικό ορυκτό, στα κρεοπαραγωγά ορνίθια και στα γαλακτοπαραγωγά ζώα, ως μυκοδεσμευτικό, είχε θετικά αποτελέσματα (Manafi και συν., 2009). Ωστόσο, σε άλλη μελέτη, ο κλινοπτιλόλιθος (ένας φυσικός ζεόλιθος) και ο μπεντονίτης, έδειξαν μικρότερη προσροφητική ικανότητα, σε σχέση με τον εκτορίτη (άλλο αργιλικό ορυκτό) (Dakovic και συν., 2008). Το ένυδρο αργιλοπυριτικό ασβέστιο-νάτριο (Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate - HSCAS), που χρησιμοποιήθηκε στο σιτηρέσιο ιχθυδίων του ασημί γατόψαρου (*Rhamdia quelen*), απέτυχε να μειώσει αποτελεσματικά τα επίπεδα των αφλατοξινών (Lopes και συν., 2009).

3.6.1 Ζωοτροφές πουλερικών

Τα πουλερικά είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στη μόλυνση με αφλατοξίνες (Souza και συν., 2008). Οι συγκεκριμένες μυκοτοξίνες έχουν σοβαρές επιπτώσεις στο ρυθμό ανάπτυξης, καθώς και στην ηπατική και νεφρική λειτουργία των ωοτόκων ορνίθων (Valdivia και συν., 2010). Για τον έλεγχο και τη μείωση των αφλατοξινών στις ζωοτροφές έχουν εφαρμοστεί αρκετές μέθοδοι, συμπεριλαμβανομένης της εφαρμογής συμπληρωματικής διατροφής, με σπόρους του *Canarium schweinfurthii*, ενός δέντρου που ευδοκιμεί στην Αφρική (Kana και συν., 2011). Ο νατριούχος μπεντονίτης (0,5%), η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* (0,2%), το ένυδρο αργιλοπυριτικό νάτριο-ασβέστιο (HSCAS) (0,5%), η αμμωνία (0,5%), και τα φαρμακευτικά σκευάσματα Formycine (0,1%) και Toxiban (0,1%), επέδειξαν αποτελεσματική δραστηριότητα, ως προσθετικά των ζωοτροφών, ενάντια στην αφλατοξίνη B₁ (Abousadi και συν., 2007). Σε μελέτη σε κρεοπαραγωγά ορνίθια, συγκέντρωση στο σιτηρέσιο 0,5% νατριούχου μπεντονίτη είχε καλύτερα αποτελέσματα από ότι η διπλάσια συγκέντρωσή του (Pasha και συν., 2007), ενώ σε άλλη μελέτη, ο συνδυασμός του μπεντονίτη με 0,5% ή 1,0% οξικού οξέος επηρέασε θετικά τις αποδόσεις των πτηνών, όπως ο ρυθμός ανάπτυξης και ο δείκτης μετατρεψιμότητας τροφής (Magnoli και συν., 2008). Η εφαρμογή του HSCAS έδειξε ενθαρρυντικά αποτελέσματα για τη δεσμευτική απέναντι στην αφλατοξίνη B₁ δράση του, σε σύγκριση με ένα συνδυασμό αργίλου και ζύμης, που χρησιμοποιήθηκε στη διατροφή κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Zhao και συν., 2010). Ακόμα, άλλοι ερευνητές απέδειξαν ότι το HSCAS ευνοεί και κάποιες φυσιολογικές παραμέτρους του κρέατος των κρεοπαραγωγών ορνιθίων, αυξάνοντας την περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες, και μειώνοντάς την σε λίπος (Prvulovic και συν., 2008). Επιπρόσθετα, το HSCAS, σε συνδυασμό με σκόνη του μπαχαρικού κουρκούμη (*Curcuma longa*), ήταν αποτελεσματικά απέναντι στην αφλατοξίνη B₁, βελτιώνοντας την ηπατική λειτουργία και τη σωματική ανάπτυξη των κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Gowda και συν., 2008· Zhao και συν., 2010), ενώ η χρήση του πυριτικού ορυκτού, διατομίτη, στη συγκέντρωση των 30 ppm, προτάθηκε ως εναλλακτική λύση, στη θέση των συνηθισμένων δεσμευτικών παραγόντων (Modirsanei και συν., 2008). Ωστόσο, η μη εκλεκτική φύση κάποιων δεσμευτικών παραγόντων ενδέχεται να προκαλέσει τη δέσμευση και κάποιων θρεπτικών συστατικών, στερώντας τους από τον οργανισμό του πτηνού.

Η *Nocardia corynebacteroides* έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία, απέναντι σε τροφή πουλερικών μολυσμένη με αφλατοξίνες (Tejada-Castaneda και συν., 2008). Επιπλέον, οι *Bacillus subtilis* και *Bacillus licheniformis* είναι δύο βακτηριακά στελέχη που έχουν

δείξει ικανοποιητικό βαθμό αποτοξίνωσης κατά των μυκοτοξινών, και θα μπορούσαν να εφαρμοστούν για τις αφλατοξίνες (Wei και συν., 2010), ενώ οι Ribeiro και συν. (2009) ανέφεραν ότι η γάμμα ακτινοβολία (8kGy) μπορεί να εξαλείψει όλα τα είδη του γένους *Aspergillus*, καθώς και άλλα μυκητιακά στελέχη, στο σιτηρέσιο των πουλερικών. Τέλος, η χλωροφυλλίνη έδειξε να μειώνει και να προλαμβάνει τη μόλυνση με αφλατοξίνες, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες, και αποκαθιστώντας τον αντιοξειδωτικό αμυντικό μηχανισμό των κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Thakur και συν., 2008).

3.6.2 Άλλες ζωοτροφές

Παρά το γεγονός, ότι, στα μηρυκαστικά, η μόλυνση του σιτηρεσίου με μυκοτοξίνες, και ειδικότερα αφλατοξίνες, μειώνεται από τη μικροχλωρίδα της μεγάλης κοιλίας, λόγω διαφόρων βιο-μετατροπών (Upadhaya και συν., 2010· Zain, 2011), εξακολουθεί να υφίσταται η ανάγκη να αναπτυχθούν μέθοδοι για τον έλεγχο και τη μείωση των επιπέδων μόλυνσης, διότι ο προστατευτικός φραγμός της μεγάλης κοιλίας μπορεί να δυσλειτουργήσει, αυξάνοντας το ρυθμό απορρόφησης των αφλατοξινών στην αιματική κυκλοφορία (Fink-Gremmels, 2008). Σε μια μελέτη, η εφαρμογή αποξηραμένου και παγωμένου φλοιού εσπεριδοειδών (Freeze Dried Citrus Peel - FDCP) οδήγησε σε μείωση της μόλυνσης με αφλατοξίνες, δίχως να παρεμβαίνει στις διεργασίες ζύμωσης της μεγάλης κοιλίας (Ahn και συν., 2009).

3.7 Αφλατοξίνες σε τρόφιμα παραγόμενα από μολυσμένα ζώα

Οι αφλατοξίνες M_1 και M_2 (που ονομάστηκαν έτσι, ως αφλατοξίνες του γάλακτος - milk, ενώ αργότερα συνδέθηκαν και με το κρέας - meat) είναι θερμοανθεκτικοί, υδροξυλιωμένοι μεταβολίτες, οι οποίοι παράγονται από γαλακτοπαραγωγά ζώα, που καταναλώνουν ζωοτροφές μολυσμένες με αφλατοξίνες. Έτσι, η κατάποση των αφλατοξινών B_1 και B_2 οδηγεί στο μεταβολισμό τους στις αφλατοξίνες M_1 και M_2 , αντίστοιχα, με εκτιμώμενη αναλογία μετατροπής, 1-3%, ανάμεσα στις AFB_1 και AFM_1 (Barbieri και συν., 1994· Herzallah, 2009).

Η αφλατοξίνη M_1 (AFM_1) στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα ενέχει σημαντικούς κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία. Τα θηλαστικά που καταναλώνουν τροφές μολυσμένες με αφλατοξίνη B_1 , απεκκρίνουν με το γάλα τους ποσότητες από τον υδροξυλιωμένο μεταβολίτη της, την αποκαλούμενη "τοξίνη του γάλακτος" ή αφλατοξίνη M_1 (Milk toxin).

Τα αποδεκτά όρια της AFB₁ και των συνολικών αφλατοξινών στα τρόφιμα είναι 5 και 10 µg/kg, αντίστοιχα, σε περισσότερες από 75 χώρες σε όλο τον κόσμο, ενώ τα όρια στην Ευρωπαϊκή Ένωση είναι 2 και 4 µg/kg, αντίστοιχα (Lopez και συν., 2003· Van Egmond και Jonker, 2004).

Το πιο ανησυχητικό πρόβλημα με την πάροδο των ετών, ήταν η μόλυνση του γάλακτος με αφλατοξίνες, καθώς οι αγελάδες και οι αίγες, που αποτελούν τους κύριους παραγωγούς του γάλακτος που καταναλώνεται από τον άνθρωπο, επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό, όταν τρέφονται με μολυσμένες ζωοτροφές (Helferich και συν., 1986· Lopez και συν., 2003). Εξάλλου, είναι σημαντικό να ληφθεί υπ' όψη ότι οι συγκεντρώσεις της AFM₁ στο γάλα ποικίλλουν, και εξαρτώνται, όχι μόνο από τη φυλή των βοοειδών, αλλά και από τη συγκέντρωση της AFB₁ στο σιτηρέσιο, την ποσότητα και τη διάρκεια της κατανάλωσης μολυσμένης τροφής, και την υγεία του ζώου.

Έχουν βρεθεί διαφορές ανάμεσα στις ποσότητες των αφλατοξινών M, που παράγονται από διαφορετικές φυλές βοοειδών. Σε μια ανασκόπηση, ο Gimeno (2004) αναφέρει ότι στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες, η σχέση ανάμεσα στη συγκέντρωση της AFB₁ στο καταναλισκόμενο σιτηρέσιο και στην AFM₁ που απεκκρίνεται στο γάλα, θα μπορούσε να είναι 300:1. Ωστόσο, η σχέση αυτή είναι μόνο μια χονδρική εκτίμηση, καθώς το εύρος κυμαίνεται από 34:1 έως 1600:1. Σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες φυλής Holstein, που κατανάλωσαν σιτηρέσια με 80, 86, 470, 557, 1493, και 1089 µg AFB₁/kg (ppb) ξηρής ουσίας, ανιχνεύθηκε AFM₁, σε συγκεντρώσεις 1.5, 0.245, 13.7, 4.7, 12.4, και 20.2 µg/L (ppb), αντίστοιχα. Από τη άλλη, όταν το σιτηρέσιο αγελάδων φυλής Brindle μολύνθηκε με 540 ppb αφλατοξίνης B₁, παρήχθησαν 0,92 ppb αφλατοξίνης M₁. Σε άλλες αγελάδες, οι τιμές της μόλυνσης στο σιτηρέσιο κυμάνθηκαν μεταξύ 64 και 1799 ppb AFB₁, δίνοντας κατάλοιπα στο γάλα, από 0,35 έως και 14,2 ppb AFM₁.

Είναι γνωστό ότι οι αγελάδες μπορούν να μετατρέψουν την AFB₁ σε AFM₁, μέσα σε 12-24 ώρες μετά την κατάποση μολυσμένης τροφής. Ακόμα και 6 ώρες μετά την κατάποση, κατάλοιπα της AFM₁ μπορεί να εμφανιστούν στο γάλα, ενώ τα υψηλότερα επίπεδα αγγίζονται μετά από μερικές ημέρες. Όταν η πρόσληψη της AFB₁ σταματήσει, η συγκέντρωση της AFM₁ στο γάλα μειώνεται μέχρι ένα μη ανιχνεύσιμο επίπεδο, μετά από 72 ώρες (Gimeno, 2004· Ozdemir, 2007).

Πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με τη μεταφορά της AFB₁ στο γάλα ως AFM₁, όταν τα γαλακτοπαραγωγά ζώα λαμβάνουν συνεχόμενα μολυσμένη τροφή, ειδικά στις αγελάδες. Έχει παρατηρηθεί ότι μια αύξηση στην AFM₁ λαμβάνει χώρα, λόγω μόλυνσης από το βακτήριο *Staphylococcus aureus*, αλλά και άλλων βακτηριακών μολύνσεων, που

σχετίζονται με τα σωματικά κύτταρα (Veldman και συν., 1992· Masoero και συν., 2007). Αντίθετα, περιορισμένες έρευνες έχουν διεξαχθεί για τη μεταφορά της AFM₁ στο γάλα, ως αποτέλεσμα μιας μεμονωμένης πρόσληψης AFB₁. Από πρακτικής άποψης, η συστηματική χρήση μολυσμένης ζωοτροφής από τους κτηνοτρόφους είναι απίθανη. Ωστόσο, τυχαία χρήση μολυσμένης τροφής μπορεί να συμβεί, οδηγώντας σε συγκεντρώσεις AFM₁ στο γάλα που υπερβαίνουν τα αποδεκτά επίπεδα (Mazzette και συν., 2009).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι αίγες αποτελούν μέρος του προβλήματος, οπότε έχουν μελετηθεί ως καλό πρότυπο, για την κατανόηση του μεταβολισμού των αφλατοξινών (Smith και συν., 1994· Mazzette και συν., 2009). Οι Mazzette και συν. (2009) βρήκαν ότι η AFB₁ που καταναλώνουν οι αίγες με την τροφή, μεταφέρεται γρήγορα στο γάλα, ως AFM₁. Η μέγιστη συγκέντρωση της AFM₁ επιτεύχθηκε 3 με 6 ώρες μετά τη χορήγηση από το στόμα καθαρής AFB₁. Στη συνέχεια, ακολούθησε μια αρνητική εκθετική τάση, και, τελικά, η τοξίνη δεν ήταν πλέον δυνατό να ανιχνευθεί, 72 ώρες μετά τη χορήγηση. Οπότε, μια περιστασιακή λήψη από το στόμα αφλατοξίνης B₁, μπορεί να οδηγήσει σε παροδική μόλυνση του αίγιου γάλακτος με αφλατοξίνη M₁.

Το γάλα έχει παράγωγα που καταναλώνονται ευρέως από τους ανθρώπους. Ανάμεσα στα παράγωγα αυτά, βρίσκονται τυριά, το βούτυρο, η γιαούρτη, η κρέμα, και το λίπος του γάλακτος. Η κατανομή της AFM₁ σε μερικά γαλακτοκομικά προϊόντα, που παρασκευάστηκαν με γάλα μολυσμένο με AFB₁, είναι περίπου: 40-60% στο τυρί, 10% στο λίπος του γάλακτος, και < 2% στο ξινόγαλο. Η AFM₁ είναι πολύ διαλυτή στο νερό, οπότε είναι ακατανόητο γιατί η τοξίνη αυτή εναποτίθεται στο τυρί, αλλά όχι και στον ορό του γάλακτος (Yousef και Marth, 1989).

Οι αφλατοξίνες δεν είναι μόνο παρούσες στο γάλα αγελάδων, αιγών και προβατίνων, αλλά και στα παράγωγά τους, ακόμα και μετά από διαδικασίες παστερίωσης. Έχουν εντοπιστεί και σε άλλα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όπως τα αυγά των ορνίθων και ινδορνίθων (γαλοπούλες). Επιπρόσθετα, κατάλοιπα των αφλατοξινών και των μεταβολιτών τους σε εδώδιμους ζωικούς ιστούς, όπως το βόειο και πρόβειο κρέας, μπορεί να αποτελούν πηγή μόλυνσης με αφλατοξίνες διαφόρων τροφίμων για τον άνθρωπο (Rodricks και Stoloff, 1977· Herzallah, 2009). Παρόλα αυτά, το γάλα αποτελεί το εκτενέστερα μελετημένο τρόφιμο, λόγω της συμμετοχής του στην ανθρώπινη διατροφή, σε όλα τα στάδια ανάπτυξης.

Οι Tajkarimi και συν. (2008), σε μελέτη που διεξήγαγαν από το Φεβρουάριο έως τον Αύγουστο του 2004, στο Ιράν, συνέλλεξαν 319 ακατέργαστα δείγματα γάλακτος από

γαλακτοκομικές μονάδες. Στο 54% των δειγμάτων, που εξετάστηκαν για την παρουσία αφλατοξίνης M_1 με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, η τοξίνη ανιχνεύτηκε με ένα μέσο όρο τιμής, το 0,057 $\mu\text{g/L}$. Σε άλλη μελέτη στο Ιράν, από τον Απρίλιο του 2003 έως το Φεβρουάριο του 2004, σε 98 δείγματα γάλακτος που συλλέχθηκαν από γαλακτοκομικές μονάδες με διαφορετικές οικολογίες (θερμοκρασία, σχετική υγρασία, κ.τ.λ.), αλλά και διαφορετικά αγροτικά προϊόντα ως ζωοτροφές, η μέση τιμή αφλατοξίνης M_1 που ανιχνεύτηκε, ήταν μεταξύ 0,041 και 0,065 $\mu\text{g/L}$ · δηλαδή χαμηλότερη από το ανώτατο επιτρεπτό όριο του 0,5 $\mu\text{g/L}$, σύμφωνα με το Φορέα Διαχείρισης Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration - FDA) (Tajkarimi και συν., 2007). Ακόμα, το 62% των δειγμάτων παστεριωμένου γάλακτος, που λήφθηκαν από διαφορετικά πολυκαταστήματα, στην πόλη Ταμπρίζ (Ιράν), βρέθηκαν μολυσμένα με αφλατοξίνη M_1 , με τιμές που υπερβαίνουν το ανώτατο ανεκτό όριο για την Ευρωπαϊκή Ένωση· τα 50 ng/L . Ωστόσο, η συγκεκριμένη αφλατοξίνη ανιχνεύτηκε στο 100% των δειγμάτων (Ghazani, 2009).

Στην Ελλάδα, η παρουσία αφλατοξίνης M_1 στο γάλα μελετήθηκε από τους Roussi και συνεργάτες (2002). Από το Δεκέμβριο του 1999 έως και το Μάιο του 2000, 114 δείγματα παστεριωμένου, υψηλής παστερίωσης (Ultra High Temperature-treated, UHT) και συμπυκνωμένου γάλακτος συλλέχθηκαν από σούπερ μάρκετ, ενώ 52 ακατέργαστα δείγματα γάλακτος από αγελάδες, πρόβατα και αίγες λήφθηκαν από διάφορους παραγωγούς γάλακτος σε όλη την Ελλάδα. Η συλλογή δειγμάτων επαναλήφθηκε από το Δεκέμβριο του 2000 έως το Μάιο του 2001, και αφορούσε 54 δείγματα παστεριωμένου γάλακτος, 23 δείγματα φρέσκου γάλακτος από δεξαμενές, και 55 δείγματα φρέσκου γάλακτος από αγελάδες, πρόβατα και αίγες. Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων που αναλύθηκαν για την αφλατοξίνη M_1 , με υγρή χρωματογραφία, ήταν 297. Στην πρώτη δειγματοληψία, τα ποσοστά εμφάνισης της AFM_1 στο παστεριωμένο, UHT, συμπυκνωμένο, φρέσκο αγελαδινό, πρόβειο και κατσικίσιο γάλα ήταν 85.4, 82.3, 93.3, 73.3, 66.7 και 40%, αντίστοιχα, με μόνο ένα νωπό γάλα αγελάδας και δύο συμπυκνωμένα δείγματα γάλακτος να υπερβαίνουν το όριο της Ε.Ε. του 0,05 $\mu\text{g/kg}$. Στη δεύτερη δειγματοληψία, τα ποσοστά εμφάνισης της AFM_1 στο παστεριωμένο, φρέσκο γάλα από δεξαμενές και φρέσκο αγελαδινό, πρόβειο και κατσικίσιο γάλα ήταν 79.6, 78.3, 64.3, 73.3 και 66.7%, αντίστοιχα, με μόνο ένα νωπό γάλα αγελάδας και ένα προβάτου να υπερβαίνουν το όριο του 0,05 $\mu\text{g/kg}$. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το τρέχον ρυθμιστικό καθεστώς στην Ελλάδα είναι αποτελεσματικό.

3.7.1 Σχηματισμός και Τοξικότητα της AFM₁

Η αφλατοξίνη B₁ μεταβολίζεται από το ηπατικό σύστημα οξειδάσης, ωστόσο μπορεί να υποστεί και άλλες μεταβολικές μετατροπές, ανάλογα με το είδος του ζωικού οργανισμού (Marsi και συν., 1974). Η ποσότητα της αφλατοξίνης M₁ που απεκκρίνεται στο γάλα, ως ποσοστό της αφλατοξίνης B₁, κυμαίνεται - κατά μέσο όρο - μεταξύ 1 και 3%, ποικίλλοντας από ζώο σε ζώο, από μέρα σε μέρα, καθώς και ανάμεσα στα αρμέγματα. Η AFM₁ μπορεί να ανιχνευτεί στο γάλα 12-24 ώρες μετά την κατανάλωση AFB₁, αγγίζοντας το υψηλότερο επίπεδο, ύστερα από λίγες ημέρες. Όταν η πρόσληψη της AFB₁ σταματήσει, η συγκέντρωση της αφλατοξίνης M₁ στο γάλα μειώνεται συνεχώς, μέχρις ένα μη ανιχνεύσιμο επίπεδο, ύστερα από 72 ώρες (Van Egmond, 1989). Οι Battacone και συν. (2003) παρατήρησαν ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στην καταναλισκόμενη δόση αφλατοξίνης B₁ και στην απέκκριση αφλατοξίνης M₁, στο γάλα της προβατίνας.

3.7.2 Υπολείμματα αφλατοξινών στα αυγά

Οι συγκεντρώσεις των μυκοτοξινών και των μεταβολιτών τους είναι γενικά πολύ χαμηλότερες στα αυγά από ό, τι στις ζωικές τροφές, και δεν είναι πιθανό να προκαλέσουν οξείες δηλητηριάσεις στον άνθρωπο. Ωστόσο, τα κατάλοιπα των καρκινογόνων μυκοτοξινών, όπως η αφλατοξίνη B₁ και M₁, και η ωχρατοξίνη A, όταν εμφανίζονται σε προϊόντα ζωικής προέλευσης αποτελούν απειλή για την ανθρώπινη υγεία και πρέπει να παρακολουθούνται. Οι Truyskens και συν. (1983) ανίχνευσαν κατάλοιπα αφλατοξίνης B₁ και M₁ σε αυγά ορνίθων οι οποίες τρέφονταν με μολυσμένες ζωοτροφές. Σύμφωνα με τους Wolzak και συν. (1985), η απομάκρυνση της αφλατοξίνης συμβαίνει ταχύτερα στα ασπράδια σε σύγκριση με τον κρόκο. Οι αφλατοξίνες και μερικοί μεταβολίτες τους μπορεί να μεταφερθούν από τις ζωοτροφές στα αυγά, σε αναλογίες 5000:1 μέχρι και 125.000:1, ενώ σε άλλες μελέτες δεν ανιχνεύτηκαν μετρήσιμα κατάλοιπα αφλατοξίνης B₁ ή των μεταβολιτών της σε αυγά (Oliveira και συν., 2002). Ο Zaghini και συν. (2005) αναφέρουν ότι δεν βρέθηκαν κατάλοιπα αφλατοξίνης B₁ ή M₁ σε αυγά ορνίθων η διατροφή των οποίων περιείχε 2,50 ppm αφλατοξίνης B₁. Σε μια άλλη μελέτη, οι Salwa και Anwer (2009) αναφέρουν ότι δεν βρέθηκαν υπολείμματα αφλατοξινών στα αυγά των ορνίθων, η τροφή των οποίων περιείχε 25, 50 και 100 ppb αφλατοξίνης για 60 ημέρες.

3.8 Άλλα τρόφιμα

Ακόμα, αφλατοξίνες είναι δυνατό να ανιχνευθούν και σε διάφορα άλλα τρόφιμα που καταναλώνονται από τον άνθρωπο, όπως αποξηραμένα φρούτα, τρόφιμα "ντελικάτέσεν", μπαχαρικά, κρασιά, όσπρια, φρούτα, γάλα, και γαλακτοκομικά προϊόντα (Gimeno, 2004· Wild και Gong, 2010).

4. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ

Ένα από τα πιο σημαντικά στάδια του ποιοτικού και του ποσοτικού προσδιορισμού των αφλατοξινών είναι η προετοιμασία των δειγμάτων. Οι διαδικασίες προετοιμασίας και επεξεργασίας των δειγμάτων για τον ποσοτικό προσδιορισμό των μυκοτοξινών ποικίλλουν, και μπορεί να παρατηρηθεί εξέλιξη στις διαδικασίες αυτές, με τις παλαιότερες να βασίζονται στην εκχύλιση υγρού-υγρού και τις νεότερες να στοχεύουν στην αποφυγή της χρήσης των βλαβερών για το περιβάλλον και τον άνθρωπο οργανικών διαλυτών, π.χ. οργανοχλωριωμένων, και στην πιο αποδοτική απομόνωση των αναλυτών από το δείγμα.

4.1 Μέθοδοι απομόνωσης και καθαρισμού

Οι αφλατοξίνες προσδιορίζονται σε ξηρούς καρπούς, στα δημητριακά, στο καλαμπόκι στα μπαχαρικά και, ως μεταβολίτες, στο γάλα και στα παράγωγα διατροφικά προϊόντα (Hussain και συν., 2008· Tekinsen και συν., 2008), και σε μικρότερο βαθμό στις ζωοτροφές (Fraga και συν., 2007· Thieu και συν., 2008). Η δειγματοληψία αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για την ανάλυση των μολυσμένων τροφίμων και ζωοτροφών. Οι κατάλληλες διαδικασίες δειγματοληψίας μειώνουν τη μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων και τον αριθμό των παρτίδων με λανθασμένα προσδιορισμένες συγκεντρώσεις αφλατοξινών (Whitaker, 2006). Η πιθανότητα των σφαλμάτων που οφείλονται σε δειγματοληψία είναι υψηλότερη σε σχέση με αυτή της αναλυτικής διαδικασίας. Είναι σημαντική η αφαίρεση των ενδιάμεσων συστατικών με σκοπό τον μέγιστο δυνατό καθαρισμό της αναλυόμενης ουσίας. Έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικές διαδικασίες απομόνωσης, όπως η απομόνωση με χλωριωμένους διαλύτες που σήμερα έχουν απαγορευτεί (Bourais και συν., 2006).

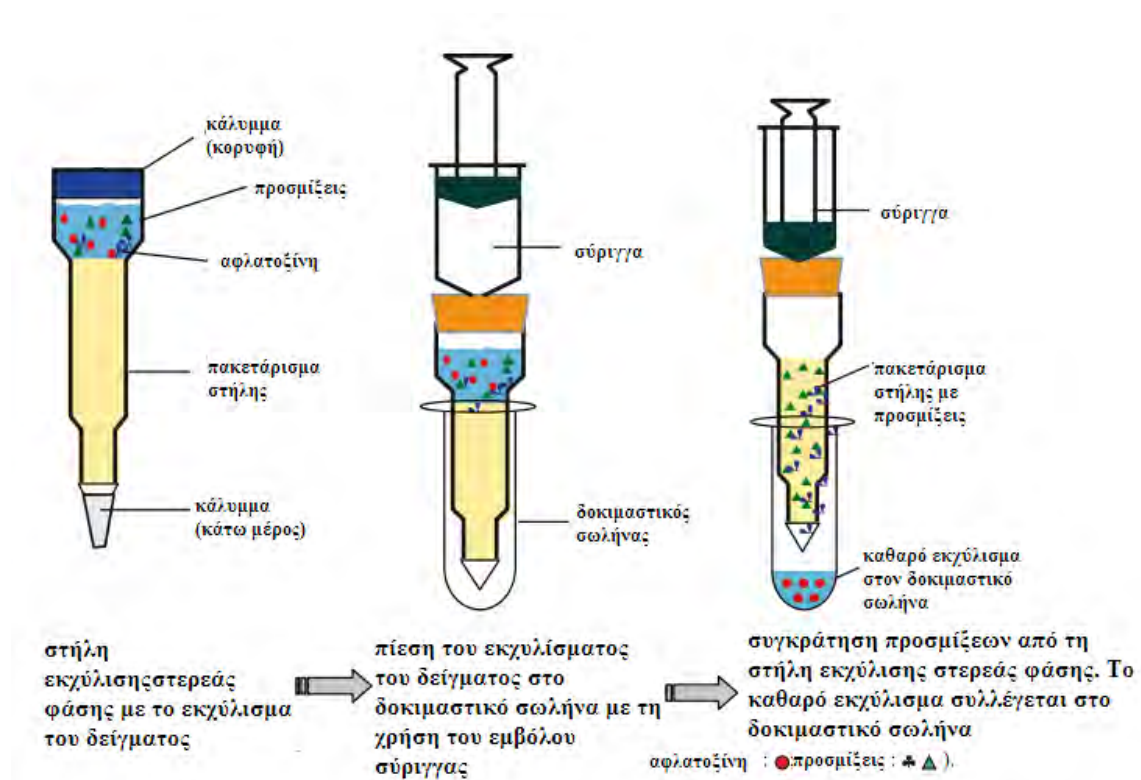
Σήμερα, η απομόνωση των αφλατοξινών πραγματοποιείται με τη χρήση ενός μείγματος νερού και οργανικών διαλυτών, π.χ. ACN (ακετονιτρίλιο), μεθανόλη (MeOH) ή ακετόνη. Η εκχύλιση υγρού ή στερεού σώματος διαλυμένου σε υγρό με άλλο υγρό (liquid-liquid extraction), βασίζεται στην κατανομή των αναλυόμενων ουσιών σε δύο φάσεις. Τα μεγαλύτερα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ο σχετικά μεγάλος όγκος των οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιείται, η δημιουργία γαλακτωμάτων, η χρονοβόρα διαδικασία και η μη ποσοτική και μη επαναλήψιμη παραλαβή των ενώσεων του δείγματος.

Το γεγονός αυτό οδήγησε στην αντικατάσταση της μεθόδου είτε από την εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE - Solid Face Extraction) ή την απομόνωση ανοσοσυγγενείας (immunoaffinity extraction.)

Ο Bourais και οι συνεργάτες του (2006) αναφέρουν στη μελέτη τους ένα σύστημα καθαρισμού δύο φάσεων σε δείγματα τροφίμων. Αρχικά, τα δείγματα εκχυλίζονται με έναν οργανικό διαλύτη (MeOH), και στη συνέχεια ο διαλύτης εξατμίζεται και επαναδιαλύονται σε τολουόλιο. Η φάση του τολουολίου ανακινείται με την προσθήκη υδατικής φάσης, όπως το PBS (phosphate buffered saline) / MeOH (35:65) σε έναν αναδευτήρα και αναδεύεται επί 30 λεπτά. Οι φάσεις διαχωρίζονται σε μια χοάνη και συλλέγεται η υδατική φάση. Η ποσοτικοποίηση των αφλατοξινών πραγματοποιήθηκε με μέτρηση φθορισμού στα 350 nm, χωρίς χρωματογραφικό διαχωρισμό. Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι η χρήση του χλωροφορμίου για την αρχική απομόνωση οδήγησε στη λήψη καλών ποσοστών ανάκτησης.

Τα καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν με τους διαλύτες απομόνωσης χλωροφόρμιο-νερό και νερό-ACN, οι οποίοι έχουν δείξει καλά αποτελέσματα ανάλυσης μετά τον προσδιορισμό με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή φθορισμού (HPLC-FLD, High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detector) (Muller και συν., 2004). Ο Stroka και οι συνεργάτες του (2000) αξιολόγησαν τις αλληλεπιδράσεις των διαφόρων διαλυτών που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των αφλατοξινών από δείγματα τροφίμων και μελέτησαν την πιθανή προσρόφηση νερού από το υλικό της στήλης. Τα δείγματα εκχυλίστηκαν με διαφορετικούς συνδυασμούς οργανικών διαλυτών και νερό. Μετά την αραίωση με PBS, τα δείγματα είχαν καθαριστεί με στήλες ανοσοσυγγενείας (IACs – Immunoaffinity Columns) πριν από την χρωματογραφία HPLC-FLD. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές αναφέρουν ότι η χρήση υδατικών εκχυλισμάτων ακετονιτριλίου είναι περιορισμένη λόγω του γεγονότος ότι το ξηρό υλικό του δείγματος μπορεί να απορροφήσει σημαντικές ποσότητες νερού από το εκχύλισμα. Η μέγιστη απώλεια εμφανίστηκε μέσω του διαλύτη ακετονιτρίλιο - νερό (24%), γεγονός το οποίο οδηγεί σε αναξιόπιστα αποτελέσματα, σε αντίθεση με τη χρήση των διαλυτών μεθανόλη - νερό, οι οποίοι αποδίδουν αξιόπιστα αποτελέσματα (Stroka και συν., 2000). Επιπλέον, έχει μελετηθεί από μερικούς ερευνητές αν η απομόνωση θα πρέπει να πραγματοποιείται με ξηρή ή υδάτινη ανάμιξη, για την αύξηση της ανάκτησης των δειγμάτων που υπόκεινται σε ανάλυση (Spanjer και συν., 2006). Κανονικά, η υδάτινη ανάμιξη δε χρησιμοποιείται στην καθημερινή ανάλυση. Και οι δύο συγγραφείς ανέφεραν ότι η υδάτινη ανάμιξη του συνολικού δείγματος οδήγησε σε καλύτερη

ομογενοποίηση και σε μικρότερο μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος. Με τον τρόπο αυτό, τα επιμέρους σφάλματα της δειγματοληψίας, καθώς και οι πιθανότητες για ψευδώς θετικές ή αρνητικές τιμές μειώνονται στο ελάχιστο.



Εικόνα 4.1. Στάδια εκχύλισης στερεάς φάσης

Πρόσφατα, ο Bacaloni και οι συνεργάτες του (Bacaloni και συν., 2008) δημοσίευσαν τρεις διαφορετικές μεθόδους απομόνωσης, που εφαρμόζονται σε τέσσερα διαφορετικά δείγματα καρπών με κέλυφος, συμπεριλαμβάνοντας τα φουντούκια: την ομογενοποίηση, την απομόνωση με υπέρηχους και τη διασπορά της στερεάς φάσης του υποστρώματος (MSPD – Matrix Solid Face Dispersion). Πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι απομόνωση με υπέρηχους και η ομογενοποίηση αποτελούν συγκρίσιμες μεθόδους απομόνωσης.

Η ανάκτηση με την ομογενοποίηση και τη χρήση υπερήχων κυμαίνεται από 93-101%, ενώ με την απομόνωση MSPD από 70 έως 83%. Πλεονέκτημα της απομόνωσης με την μέθοδο MSPD αποτελεί το χαμηλό κόστος σε καθαρισμό μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Η απομόνωση SFE (Supercritical fluid extraction) εφαρμόστηκε από τον Liau και τους συνεργάτες του για την απομάκρυνση των αφλατοξινών από το *Zizyphi Fructus*,

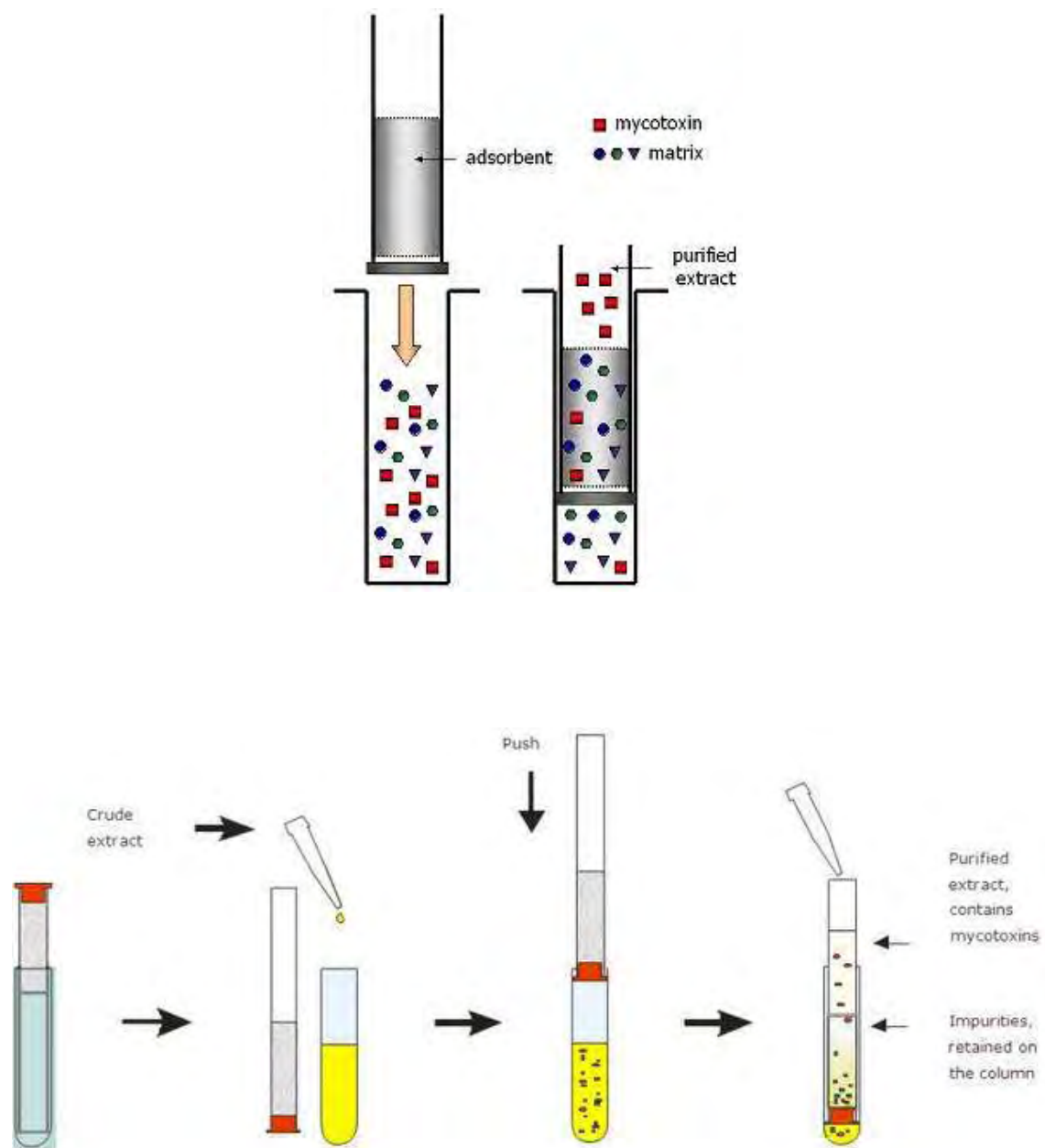
παραδοσιακό φυτό στην κινεζική ιατρική. Το CO₂ χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την στατική απομόνωση, τη συλλογή του σε οξικό αιθυλεστέρα, την εξάτμιση του και την επαναδιάλυσή του σε μεθανόλη (Liau και συν., 2007). Η ανάκτηση κυμαινόταν ανάλογα με τους διαλύτες εκχύλισης, από 28 έως 105% για την αφλατοξίνη AFB₁ (Liau και συν., 2007). Η συγκεκριμένη τεχνική έδωσε καλά αποτελέσματα λόγω της υψηλής διαλυτικής ικανότητας και της πυκνότητας του διαλύτη, αλλά δεν είναι κατάλληλη για αναλύσεις ρουτίνας λόγω του υψηλού κόστους και της ανάγκης για εξειδικευμένο εξοπλισμό.

Επιπλέον, η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE - Solid Face Extraction) ή ο καθαρισμός με τις στήλες ανοσοσυγγένειας έχουν εφαρμοστεί με μεγάλη συχνότητα στην ανάλυση των μυκοτοξινών. Κατά την εκχύλιση στερεάς φάσης (Εικόνα 4.1) οι προσδιοριζόμενες ουσίες, καθώς και οι προσμίξεις που βρίσκονται διαλυμένες σε υγρό, συγκρατούνται σε ειδικό προσροφητικό υλικό το οποίο βρίσκεται σε μικροστήλη εκχύλισης. Αφού ενεργοποιηθεί η στήλη, γίνεται προσρόφηση των προσδιοριζόμενων συστατικών και των προσμίξεων, οι οποίες απομακρύνονται με έκλυση. Σε επόμενο στάδιο εκλύονται οι προς προσδιορισμό ουσίες. Λόγω των αλληλεπιδράσεων των αναλυόμενων ουσιών με το υπόστρωμα, απορροφώνται στη στερεά φάση, και μετά από στάδιο πλύσης η αναλυόμενη ουσία εκλύεται συνήθως με οργανικούς διαλύτες, ενώ οι ενώσεις του υποστρώματος δεν προσδένονται στις στήλες. Σημαντικά πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης τεχνικής είναι η ακρίβεια, η επαναληψιμότητα καθώς και η δυνατότητα πολλών εκχυλίσεων του δείγματος με τη χρήση δύο ή περισσότερων μικροστηλών με το ίδιο προσροφητικό υλικό. Έτσι επιτυγχάνεται καλύτερος καθαρισμός του δείγματος. Οι στήλες που χρησιμοποιούνται εκτενώς περιέχουν ως υλικό πλήρωσης διοξείδιο του πυριτίου ή διοξείδιο του πυριτίου χημικά τροποποιημένο με ομάδες αμινοπροπυλίου, φαινυλίου ή κυρίως οκταδεκανίου (C18) (Scott, 1993).

Οι πολυλειτουργικές στήλες Mycosep και Multisep μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν σε ένα στάδιο καθαρισμού και αφαιρούν τις προσμείξεις, αλλά είναι λιγότερο επιλεκτικές στην προετοιμασία του δείγματος. Οι στήλες καθαρισμού Mycosep περιέχουν συνδυασμό προσροφητικών υλικών, τα οποία συσκευάζονται σε ένα πλαστικό σωλήνα. Σε αντίθεση με τη συμβατική εκχύλιση στερεάς φάσης οι αναλύτες (μυκοτοξίνες) δε συγκρατούνται από το προσροφητικό υλικό, και παραμένουν στο διάλυμα, ενώ οι υπόλοιπες ουσίες του δείγματος που παρεμποδίζουν την ανάλυση συγκρατούνται (Εικόνα 4.2).

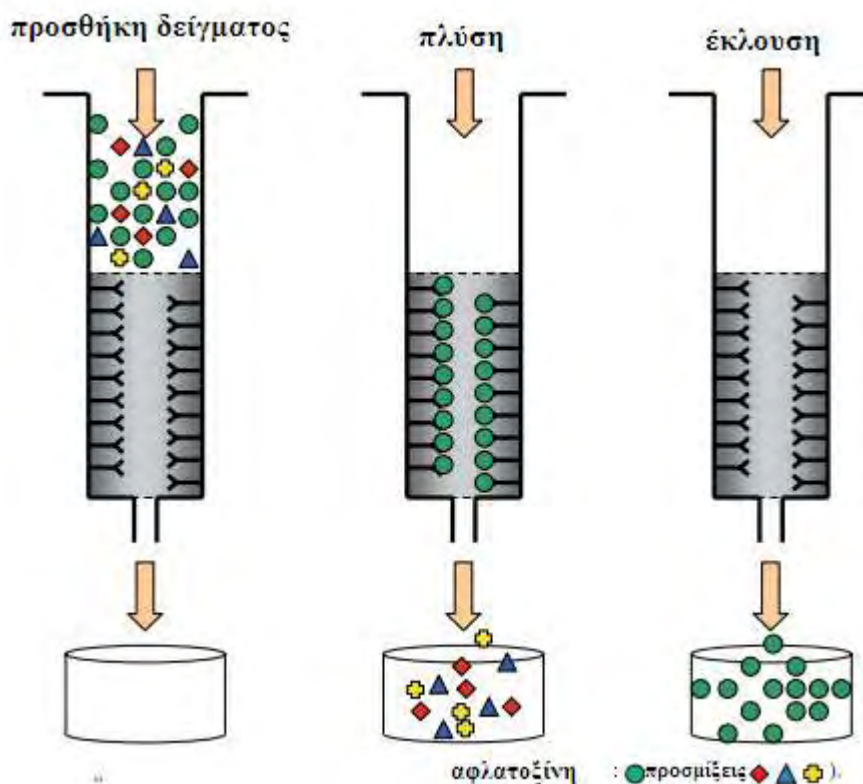
Η διαδικασία είναι πιο σύντομη και οικονομική, εφόσον αποτελείται από ένα και μόνο στάδιο και δεν απαιτούνται στάδια έκπλυσης και έκλυσης όπως στη συμβατική SPE.

Το καθαρό εκχύλισμα εμφανίζεται στην κορυφή του πλαστικού σωλήνα μέσα σε 10 έως 30 δευτερόλεπτα (Εικόνα 4.2). Οι στήλες είναι συνήθως επιλεκτικές, και κατάλληλες για απομόνωση μίας μόνο ουσίας, ενώ υπάρχουν στήλες για ένα ευρύ φάσμα των μυκοτοξινών, και ιδιαίτερα για τις Α και Β τριχοθεσίνες [<http://www.romerlabs.com/en/products/columns.html>].



Εικόνα 4.2. Αρχή λειτουργίας στήλης MycoSep. Η MycoSep® στήλη καθαρισμού ωθείται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα (που περιέχει το εκχύλισμα του δείγματος), αναγκάζοντας το εκχύλισμα να φιλτράρεται προς τα πάνω μέσα από το υλικό πλήρωσης της στήλης. Οι παρεμποδίσσεις συγκρατούνται από το υλικό πλήρωσης της στήλης, ενώ το καθαρισμένο εκχύλισμα που περιέχει τους αναλύτες ενδιαφέροντος εμφανίζεται στο πάνω μέρος της στήλης.

Οι στήλες ανοσοσυγγένειας αποτελούν σήμερα την πιο συχνή μέθοδο απομόνωσης των μυκοτοξινών (Tavcar-Kalcher και συν., 2007· Gurbay και συν., 2006). Οι στήλες ανοσοσυγγένειας (IAC) περιέχουν μονοκλωνικά αντισώματα προσδεδεμένα στο υλικό-φορέα (π.χ. σεφαρόζη). Κατά την απομόνωση, σχηματίζονται τα σύμπλοκα αντισώματος-αντιγόνου και αφαιρούνται οι ενώσεις του υποστρώματος. Στο επόμενο βήμα πλύσης τα σύμπλοκα καταστρέφονται με τη χρήση ενός οργανικού διαλύτη. Οι στήλες ανοσοσυγγένειας εφαρμόζονται ευρέως τα τελευταία χρόνια, δεδομένου ότι προσφέρουν υψηλή εκλεκτικότητα. Το υπόστρωμα της στήλης ανοσοσυγγένειας περιλαμβάνει μια στερεή φάση, στην οποία υπάρχουν δεσμευμένα αντισώματα. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται το δείγμα στη στήλη, και τα περιεχόμενα μόρια των μυκοτοξινών δεσμεύονται επιλεκτικά με τα ακινητοποιημένα αντισώματα μετά από μια φάση προετοιμασίας. Μετά την πλύση η τοξίνη απομακρύνεται με ένα διαλύτη που προκαλεί μετουσίωση των αντισωμάτων (Εικόνα 4.3). Οι προσμείξεις δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και η στήλη πλένεται για την αφαίρεση του υποστρώματος. Σήμερα, είναι διαθέσιμες πολυλειτουργικές στήλες, για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της ωχρατοξίνης Α και της ζεαραλενόνης. Σημαντικά μειονεκτήματα της μεθόδου είναι το υψηλό κόστος και ότι οι στήλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο μία φορά. Με τις στήλες ανοσοσυγγένειας επιτυγχάνεται υψηλής επιλεκτικότητας απομόνωση των αφλατοξινών από άλλα συστατικά του δείγματος που παρεμποδίζουν την ανάλυση, και αυξάνεται έτσι σημαντικά η απόδοση του χρωματογραφικού ποσοτικού προσδιορισμού τους με υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή φθορισμού (HPLC-FLD).



Εικόνα 4.3. Βασικές αρχές στηλών ανοσοσυγγένειας

4.2 Ενόργανες μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού αφλατοξινών

Η πλειοψηφία των χημικών αναλυτικών μεθόδων που εφαρμόζονται για τον ακριβή, εκλεκτικό και ευαίσθητο προσδιορισμό των μυκοτοξινών σε διάφορα δείγματα βασίζονται στην χρωματογραφία. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC-High Performance Liquid Chromatography), με διαφορετικούς ανιχνευτές, χρησιμοποιείται συχνά για αναλύσεις ρουτίνας και ως μέθοδος επικύρωσης για νέες τεχνικές ή τεχνικές διαλογής (Shephard και συν., 2005· Zougagh και Ríos, 2008). Για μερικές μυκοτοξίνες η μέθοδος που χρησιμοποιείται πιο συχνά είναι η αέριος χρωματογραφία (GC – Gas Chromatography) (Kos και συν., 2002). Εκτός από τις μεθόδους φασματομετρίας μάζας, όλες οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών βασίζονται στην ανοσοανάλυση.

Παρόμοια με άλλα στάδια ανάλυσης στον προσδιορισμό των μυκοτοξινών, το πεδίο των μεθόδων ενόργανης ανάλυσης δείχνει μεγάλη ανάπτυξη τα τελευταία δέκα χρόνια (Sforza και συν., 2006· Zöllner και συν., 2006). Η μεγάλη πλειοψηφία των παλαιότερων και των νέων μεθόδων ανίχνευσης έχουν όρια ανίχνευσης κάτω από τα αντίστοιχα ανώτατα όρια υπολειμμάτων σε δείγματα (Langseth και συν., 1998). Η κινητήρια

δύναμη πίσω από την εξέλιξη των μεθόδων ανίχνευσης, δεν είναι τόσο η ευαισθησία, αλλά η μεγαλύτερη απλοποίηση και η υψηλότερη απόδοση των νέων μεθόδων λόγω ακρίβειας και σταθερότητας των αποτελεσμάτων. Ο ανιχνευτής της επιλογής έχει γίνει το φασματόμετρο μάζας, κατά προτίμηση μάλιστα το διαδοχικό φασματόμετρο μάζας (Berthiller και συν., 2007). Κρίνοντας από τον αριθμό των δημοσιεύσεων, ο φθορισμομετρικός ανιχνευτής για την HPLC εξακολουθεί να είναι πολύ δημοφιλής, λόγω της ευαισθησίας, της επιλεκτικότητας, της χαμηλής τιμής και της ευκολίας χρήσης. Άλλοι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται για την HPLC είναι οι φασματομετρικοί ανιχνευτές ακτινοβολίας UV (Ultraviolet-Υπεριώδης ακτινοβολία).

Πίνακας 4.1. Ενόργανες μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού, αποδεκτές από την Ευρωπαϊκή Ένωση και την AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (IARC, 2002)

Είδος Αφλατοξίνης	Τρόφιμο	Μέθοδος	Όριο ανίχνευσης (μg/kg)
Όλες	Τρόφιμα και ζωοτροφές	MC	5–15
Όλες	Καλαμπόκι και Φιστίκια	MC	10
Όλες	Καλαμπόκι και Φιστίκια	IAC	10
B1, B2, G1, G2	Καλαμπόκι, Αμύγδαλα, Βραζιλιάνικα φιστίκια, Φιστίκια, Φιστίκια Αιγίνης	HPLC	5
B1	Φιστικοβούτυρο, Πάστα φιστικιών Αιγίνης, fig paste, σκόνη πάπρικας	IAC/HPLC	?
B1	Προϊόντα βαμβακόσπορου και ανάμεικτες ζωοτροφές	ELISA	15
B1	Καλαμπόκι και ψημένα Φιστίκια	ELISA	20
B1	Παιδικές τροφές	IAC/HPLC	0,1
B1, B2, G1	Καλαμπόκι, βαμβακόσπορος, Φιστίκια, Φιστικοβούτυρο	ELISA	20–30
B1, B2, G1, G2	Φιστικοβούτυρο	ELISA	9
B1, B2, G1	Καλαμπόκι	ELISA	20
B1, B2, G1, G2	Φιστίκια και παράγωγά τους	TLC	5
B1, B2, G1, G2	Σπόροι Καφέ	TLC	10

B1, B2, G1, G2	Καρύδα, κόπρα	TLC	50
B1, B2, G1, G2	Καλαμπόκι	TLC	5
B1, B2, G1, G2	Προϊόντα βαμβακόσπορου και ανάμεικτες ζωοτροφές	TLC, HPLC	10, 5
B1, B2, G1, G2	Φιστίκια Αιγίνης	TLC	15
B1, B2, G1, G2	Σόγια	TLC	10
B1, B2, G1, G2	Καλαμπόκι και Φιστικοβούτυρο	HPLC	5
B1, B2, G1, G2	Καλαμπόκι και Φιστίκια	TLC	1,5–1
B1, B2, G1, G2	Καλαμπόκι, Φιστίκια, Φιστικοβούτυρο (Aflatest)	IAC/HPLC	10
B1, B2, G1, G2	Πράσινος καφές	TLC	25
B1	Αυγά	TLC	0,1
B1 και M1	Συκώτι	TLC	0,1
M1	Γαλακτοκομικά προϊόντα	TLC	0,1
M1	Γάλα και τυρί	TLC	0,1
M1 και M2	Γάλα	HPLC	0,1
All, B1	Δημητριακά, ξηροί καρποί και παράγωγα προϊόντα	IAC/HPLC	8
M1	Γάλα και γάλα σκόνη	IAC/HPLC	0,08 σε σκόνη
			0,008 µg/L στο υγρό γάλα
B1	Ανάμεικτες ζωοτροφές	HPLC	1
B1	Ζωοτροφές	TLC/φθορισμός	4

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)- ενζυμοσύνδετη ανασοπροσροφητική μέτρηση, TLC (Thin Layer Chromatography)-Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας, HPLC (High Performance Liquid Chromatography)- Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης, MC (Mini column)-μικροστήλες, IAC (Immunoaffinity column)- Στήλες ανοσοσυγγένειας

4.2.1 Υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (LC-MS)

Η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας (LC-MS, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) αποτελεί τα τελευταία δέκα χρόνια την καθοριστική μέθοδο ανάλυσης των μυκοτοξινών. Οι λόγοι είναι, μεταξύ άλλων, η

διασύνδεση του αποτελεσματικού ηλεκτροψεκασμού και του χημικού ιονισμού υπό ατμοσφαιρική πίεση, η εξέλιξη στον τομέα των αναλυτών μάζας, καθώς και η σημαντική απλοποίηση της χρήσης και της οικονομικής προσιτότητας των διαδοχικών φασματογράφων μάζας. Πριν από την ανάπτυξή τους, οι αναλύσεις των μυκοτοξινών πραγματοποιούνταν με τη χρήση θερμοψεκασμού, τεχνική που εμφάνιζε σημαντικές δυσκολίες (Langseth και συν., 1998). Η σύγχρονη υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας με τον ηλεκτροψεκασμό και τον χημικό ιονισμό υπό ατμοσφαιρική πίεση, με ανίχνευση των θετικών ή των αρνητικών ιόντων, καθώς και την ταυτόχρονη, στην ίδια ανάλυση, εναλλάξ ανίχνευση και των δυο με διαδικασία εναλλαγής δυναμικού (Berthiller και συν., 2007), αποτελεί την καλύτερη δυνατή μέθοδο για την ανίχνευση όλων των αναλυόμενων ουσιών.

Η τεχνική των μεθόδων υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας έγκειται στη δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης πολλών ουσιών. Λόγω του συγκεκριμένου τρόπου ανίχνευσης, η επίτευξη των βέλτιστων χρωματογραφικών συνθηκών αφορά στη ρύθμιση του pH και των πρόσθετων στην κινητή φάση με σκοπό το βέλτιστο ιονισμό των αναλυόμενων ουσιών στην πηγή ιόντων. Δεδομένου ότι οι μυκοτοξίνες ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό στην πολικότητα, μοριακή μάζα κ.λπ., ο βέλτιστος ιονισμός μπορεί να επιτευχθεί μόνο με σύγχρονα μηχανήματα, με γρήγορη εναλλαγή μεταξύ αρνητικών και θετικών καταστάσεων ιονισμού που απαιτούνται από τις διαφορετικές χημικές τάξεις (Langseth και συν., 1998). Η προετοιμασία των δειγμάτων και κυρίως ο καθαρισμός των ουσιών παρουσιάζει σημαντικές δυσκολίες, καθώς στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στην πολικότητα και στις λειτουργικές ομάδες των αναλυόμενων ουσιών. Η ταυτόχρονη απομόνωση διαφορετικών χημικών ομάδων χωρίς σημαντική μεταφορά υποστρώματος είναι συνεπώς σχεδόν αδύνατη. Εάν δεν εφαρμόζεται καθαρισμός, είναι αναμενόμενη η σημαντική και απρόβλεπτη καταστολή του ιονισμού των διαφόρων μυκοτοξινών (Spanjer και συν., 2008). Οι πιο πρόσφατα αναπτυγμένες μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας επιτρέπουν την ανάλυση ομάδων μυκοτοξινών με παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες.

Για τις Α-τριχοθεσίνες, χρησιμοποιήθηκε η συγκεκριμένη μέθοδος με τη δευτεριωμένη τοξίνη T-2 ως εσωτερικό πρότυπο (Razzazi-Fazeli και συν., 2002), ενώ σε άλλη έρευνα με διαδοχικές φασματομετρίες μάζας και ηλεκτροψεκασμό αρνητικών ιόντων (Laganà και συν., 2003), απέδωσε καλύτερα αποτελέσματα για τέσσερις Β-τριχοθεσίνες, σε σύγκριση με το χημικό ιονισμό και στις δύο καταστάσεις. Ο ηλεκτροψεκασμός με τη διαδοχική φασματομετρία μάζας εφαρμόστηκε στην ημι-ποσοτική ανάλυση των μη-

μακροκυκλικών και μακροκυκλικών τριχοθεσινών σε δείγματα από εσωτερικά περιβάλλοντα (Tuomi και συν., 1998).

Έχουν δημοσιευτεί αρκετές μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας για τον προσδιορισμό των οιστρογονικών μυκοτοξινών Fusarium (Maragou και συν., 2008) με ανιχνευτή απλό τετράπολο ή τριπλό τετράπολο, σε περίπτωση διαδοχικής φασματομετρίας μάζας. Οι ενώσεις των υποστρωμάτων μπορούν να προκαλέσουν σημαντική καταστολή του ιονισμού της προσδιοριζόμενης ουσίας (Krska και συν., 2007), επομένως η χρήση των εσωτερικών προτύπων είναι απαραίτητη για την ποσοτικοποίηση. Για το σκοπό αυτό έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ένα δομικό ανάλογο της ζεαραλανόνης (Maragou και συν., 2008).

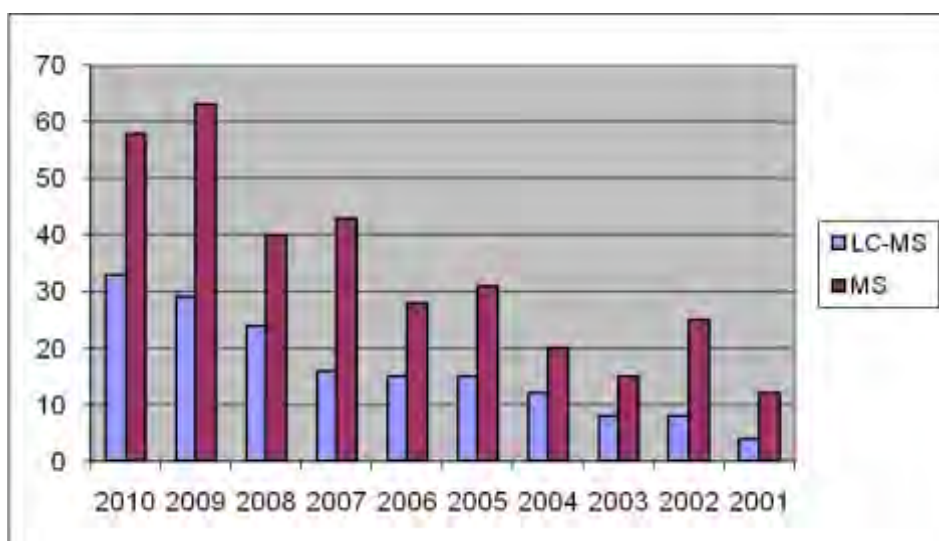
Οι φουμονισίνες αποτελούν μια άλλη ομάδα μυκοτοξινών Fusarium που απαντώνται κυρίως στο καλαμπόκι. Η ανάλυσή τους πραγματοποιείται με χρωματογραφία - διαδοχική φασματομετρία μάζας MS (Faberι και συν., 2005). Ο ιονισμός ηλεκτροψεκασμού εφαρμόζεται στις περισσότερες μεθόδους υγρής χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας για τις αφλατοξίνες (Blesa και συν., 2003), ενώ ο χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης αρκετά λιγότερο (Xavier και συν., 2008), διότι αποτελεί λιγότερο αποτελεσματική μέθοδο, εκτός από την περίπτωση της πρόδρομης αφλατοξίνης, στεριγματοκυστίνης (Zöllner και συν., 2006). Ο φωτοϊονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης αποτελεί καλύτερη εναλλακτική μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού, σε σχέση με τον χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (Zöllner και συν., 2006). Οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν απουσία επίδρασης του υποστρώματος (matrix) στον ιονισμό των αναλυτών και καταστολή του ιονισμού (Zöllner και συν., 2006), ενώ ο Cervino και οι συνεργάτες του (Cervino και συν., 2008) βρήκαν ανεξάρτητη από το υπόστρωμα απόκριση για τις αφλατοξίνες AFB₂ και AFG₂, και ισχυρή εξάρτηση από το υπόστρωμα για άλλες αφλατοξίνες, ακόμα και κατά τη χρήση δευτεριωμένων εσωτερικών προτύπων.

Οι ωχρατοξίνες, ειδικά η ωχρατοξίνη A, είναι μια άλλη ομάδα επιβλαβών μυκοτοξινών για τις οποίες, λόγω του φυσικού φθορισμού τους, υπάρχουν αρκετές καθιερωμένες και ευαίσθητες μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας-ανίχνευσης φθορισμού. Η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας έχει χρησιμοποιηθεί συγκριτικά πιο συχνά για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών της ωχρατοξίνης A και των προϊόντων της φωτοαποικοδόμησης (Kralj Cigić και συν., 2006). Σε μια άλλη μελέτη, ο Takino και οι συνεργάτες του αναφέρουν ότι στο φωτοϊονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης υπάρχει

μικρότερος χημικός θόρυβος και καταστολή του ιονισμού, σε σύγκριση με το χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (Takino και συν., 2003).

Για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών χρησιμοποιούνται οι ανιχνευτές απλό τετράπολο (Garon και συν., 2006), τριπλό τετράπολο (Spanjer και συν., 2008) καθώς και μέσα γραμμικής παγίδευσης ιόντων (Sulyok και συν., 2007). Στις περισσότερες μελέτες οι αναλύσεις πραγματοποιούνται με τη χρήση ηλεκτροψεκασμού (ESI – Electrospray Ionisation), ενώ σε μερικές χρησιμοποιείται παράλληλα και ο χημικός ιονισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI – Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) θετικών ιόντων (Pazzi και συν., 2005) για την ανίχνευση των αφλατοξινών. Συγκρίνοντας τον ESI με τον φωτοϊονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης, ο τελευταίος δίνει χαμηλότερο χημικό θόρυβο, μικρότερη καταστολή του σήματος και ένα χαμηλότερο όριο ποσοτικοποίησης για την AFB₁, παρόλο που ο ηλεκτροψεκασμός είναι πιο ισχυρός (Takino και συν., 2004). Η ποσοτικοποίηση των αφλατοξινών συνήθως επιτυγχάνεται με εξωτερική βαθμονόμηση με πρότυπα διαλύματα μυκοτοξινών, αν και το [13CD₃]-AFB₁ έχει χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό πρότυπο (Edinboro και συν., 2005).

Πιο πρόσφατα, συντέθηκαν οι δευτεριωμένες AFB₂ και AFG₂ έπειτα από την καταλυτική δευτερίωση της AFB₁ και AFG₁, αντίστοιχα (Cervino και συν., 2008). Αυτές οι δύο ισοτοπικά επισημασμένες ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μιας βασικής δοκιμασίας αραίωσης ισοτόπων για τις αφλατοξίνες στα τρόφιμα, με τη μέθοδο LC- MS / MS.



Εικόνα 4.4. Εξέλιξη στις εφαρμογές της LC-MS και συνολικά MS (LC-MS, GC-MS, MALDI-TOF κ.α.) στην ανάλυση των μυκοτοξινών: ο αριθμός των δημοσιεύσεων αυξήθηκε σημαντικά την τελευταία δεκαετία με την LC-MS να αποτελεί τη βασική μέθοδο ανάλυσης μυκοτοξινών.

4.2.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή φθορισμού (HPLC-FL)

Ο διαχωρισμός των αφλατοξινών πραγματοποιείται εδώ και πολλά χρόνια με HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (Sydenham και συν., 1996). Αν και έχουν χρησιμοποιηθεί στήλες κανονικής και ανεστραμμένης φάσης, η συντριπτική πλειοψηφία των διαχωρισμών εκτελείται με συστήματα ανεστραμμένης φάσης, με κινητές φάσεις που αποτελούνται από μείγματα νερού, μεθανόλης και ακετονιτρίλιου. Έχει αναφερθεί ότι δυαδικά συστήματα νερού και μεθανόλης οδηγούν σε ευρείες κορυφές HPLC, ενώ διμερή μείγματα νερού και ακετονιτρίλιου δεν μπορούν να αποδώσουν ανάλυση αναφοράς (Stroka και συν., 2000). Ως αποτέλεσμα, η βέλτιστη κινητή φάση αποτελεί μίγμα και των τριών διαλυτών, προσαρμοσμένων με τα χαρακτηριστικά της στήλης HPLC. Η χρωματογραφική απόδοση έχει βελτιωθεί με την τεχνολογία στήλης, ιδιαίτερα με το μειωμένο μέγεθος του υλικού συσκευασίας της στήλης.

Ο ανιχνευτής φθορισμού προφέρει υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία για την ανάλυση μυκοτοξινών. Για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών με φυσικό φθορισμό υπάρχουν αρκετές καλά επικυρωμένες, αξιόπιστες και ευαίσθητες μεθοδολογίες που βασίζονται στην ενόργανη LC ανάλυση (αφλατοξίνες, ωχρατοξίνη Α) (Zöllner και συν., 2006). Σε σύγκριση με την υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας LC-MS, η LC-FL είναι ακριβέστερη στον ποσοτικό προσδιορισμό, όπου η επίδραση του υποστρώματος είναι αμελητέα σε σύγκριση με τα πιθανά προβλήματα της ποσοτικοποίησης με τη LC-MS (Sforza και συν., 2006). Οι φθορίζουσες ενώσεις, θα πρέπει να είναι καλά διαχωρισμένες στη χρωματογραφική στήλη, για να καταστεί δυνατή η αξιόπιστη ποσοτικοποίηση. Συνήθως, χρησιμοποιείται μια αντίστροφη στατική φάση, π.χ. C18.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC έχει επίσης εφαρμοστεί στις πολικές τοξίνες (Wilkes και συν., 1998). Η κινητή φάση πρέπει να αποτελείται από όξινη υδατική φάση (οξικό οξύ, τριφθοροοξικό οξύ,) για την αποφυγή ιονισμού των καρβοξυλικών ομάδων και βαθμιδωτή έκλυσης, με συστήματα με μεθανόλη - νερό ή το ακετονιτρίλιο - νερό (Wilkes και συν., 1998). Πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν στατική φάση από διοξείδιο του πυριτίου, ενώ η κινητή φάση αποτελείται από ακετονιτρίλιο και νερό με οξικό οξύ (περίπου 1:1) (Sibanda και συν., 2002· Aresta και συν., 2006). Εναλλακτικά, επιλέγεται στήλη φαινυλ-εξανίου (Mortensen και συν., 2003). Η μεθανόλη χρησιμοποιείται μερικές φορές αντί του ακετονιτρίλιου (Blesa και συν., 2004) ή μίγμα και των δύο (González-Peñas και συν., 2006).

Υπάρχουν μικρές διακυμάνσεις στις χρωματογραφικές συνθήκες και μερικές καινοτόμες προσεγγίσεις περιλαμβάνουν αυτοματοποίηση της αναλυτικής διαδικασίας (Brera και

συν., 2003), και χρησιμοποίηση των κυκλοδεξτρινών (Maragos και συν., 2008) για την ενίσχυση του φθορισμού. Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στις μεθόδους επεξεργασίας των δειγμάτων, για την ελαχιστοποίηση της επίδρασης του υποστρώματος στην απόδοση της χρωματογραφικής ανάλυσης.

Η ωχρατοξίνη Α αποτελεί τη μυκοτοξίνη που προσδιορίζεται κυρίως με την μέθοδο HPLC-FL, λόγω φυσικού φθορισμού. Ο χρόνος συγκράτησης της ωχρατοξίνης Α υπό αυτές τις συνθήκες είναι κάτω από 15 λεπτά. Ο φθορισμός συνήθως διεγείρεται με ακτινοβολία $\lambda=330-334$ nm, και η εκπομπή μετريέται σε 460-464 nm (Blesa και συν., 2004), αλλά κάποιοι ερευνητές χρησιμοποιούν χαμηλότερα μήκη κύματος διέγερσης, στα 225 nm (González-Peñas και συν., 2006) ή 247 nm (Jornet και συν., 2000), και διαφορετικό μήκος κύματος εκπομπής, στα 480 nm (Jornet και συν., 2000). Στις περιπτώσεις αλληλεπίδρασης με το υπόστρωμα, ο προσδιορισμός της ταυτότητας της ωχρατοξίνης Α επιτυγχάνεται με παραγωγή προς τη φθορίζουσα μεθυλο-ωχρατοξίνη Α με την υγρή χρωματογραφία LC-MS (Blesa και συν., 2004). Σχεδόν όλες οι μελέτες εφαρμόζουν εξωτερική βαθμονόμηση (Serra και συν., 2004).

Οι φουμονισίνες οι οποίες παράγονται από το γένος *Fusarium*, στερούνται τα κατάλληλα χρωμοφόρα και για το λόγο αυτό ο προσδιορισμός τους απαιτεί παραγωγοποίηση (EMAN, 2003).

Η ανίχνευση των αναλόγων αφλατοξίνης με την HPLC πιο συχνά επιτυγχάνεται με την εφαρμογή της ανίχνευσης φθορισμού. Παρά το γεγονός ότι οι αφλατοξίνες είναι φυσικά έντονα φθορίζουσες ενώσεις, τα ανάλογα τους παρουσιάζουν πολύ μειωμένο ή καθόλου φθορισμό, ο οποίος εξαρτάται από το διαλύτη που χρησιμοποιείται. Οι αφλατοξίνες που έχουν φυσικό φθορισμό είναι οι AFB₂ και AFG₂, ενώ οι AFB₁ και AFG₁ πρέπει να παραγωγοποιούνται με σκοπό την ενίσχυση του φθορισμού τους (Hernández Hierro και συν., 2008). Συνήθως παραγωγοποιούνται στη μορφή ημιακετάλης, πριν από κάθε χρωματογραφικό διαχωρισμό, χρησιμοποιώντας το τριφθοροξικό οξύ (Hernández Hierro και συν., 2008). Αρχικά, η παραγωγοποίηση γινόταν πριν το έκλουσμα εισαχθεί στη στήλη (precolumn derivatisation), με την προσθήκη του ισχυρού τριφθοροξικού οξέος (TFA), το οποίο προκαλεί ενυδάτωση του 8,9-δεσμού και οδηγεί στο σχηματισμό της ημιακετάλης AFB_{2a} και AFG_{2a}, οι οποίες διαθέτουν παρόμοιες ιδιότητες φθορισμού με τις AFB₂ και AFG₂. Ωστόσο, η σχετική αστάθεια αυτών των παραγώγων στη μεθανόλη (διαλύτης κινητής φάσης), και τα πλεονεκτήματα της αυτοματοποίησης που προσφέρει η παραγωγοποίηση μετά την είσοδο του εκλούσματος στη στήλη (post-column

derivatisation), οδήγησαν στην αντικατάσταση της παλιάς μεθόδου και τη χρήση της τελευταίας αυτής τεχνικής (Stroka και συν., 2000).

Αν και η χρήση του τριφθοροξικού οξέος (TFA) ως αντιδραστήριο στη μέθοδο post-column δεν είναι κατάλληλη λόγω προβλημάτων διάβρωσης, η αντίδραση με αλογόνα στον 8,9-διπλό δεσμό βρέθηκε να αποτελεί κατάλληλη εναλλακτική λύση. Η μέθοδος παραγωγοποίησης με ιώδιο έγινε αποδεκτή ως επίσημη μέθοδος από τον AOAC-IUPAC.

Παρόλο που η μέθοδος είναι αποδοτική και τα αποτελέσματα είναι αξιόπιστα, αναφέρονται πολλά μειονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένης της ανάγκης για μια ξεχωριστή αντλία και μιας θερμαινόμενης σπείρας αντίδρασης, η οποία μπορεί να προκαλέσει διεύρυνση των κορυφών, και την πιθανή κρυστάλλωση του ιωδίου σε πιθανή λανθασμένη λειτουργία των συστημάτων. Επιπλέον, απαιτείται αρκετός χρόνος για τη σταθεροποίηση της θερμοκρασίας της κινητής φάσης στους 75° C, καθώς και η χρήση κορεσμένων διαλυμάτων που συνεισφέρει στη φθορά της αντλίας, λόγω συνεχόμενης επαφής με το οξειδωτικό ιώδιο. Κατά συνέπεια, χρησιμοποιήθηκε ένα άλλο αλογόνο, το βρώμιο, το οποίο είναι ισχυρότερο οξειδωτικό από το ιώδιο και οδηγεί σε καλύτερη απόδοση (Stroka και συν., 2000). Η βρωμίωση μπορεί να επιτευχθεί με ένα ηλεκτροχημικό σύστημα παραγωγής, το λεγόμενο Kobra cell. Για τη μέθοδο αυτή, βρωμιούχο κάλιο διαλύεται σε όξινη κινητή φάση.

Η εναλλακτική αυτή μέθοδος απαιτεί μια αντλία για την προσθήκη του πυριδινικού βρωμιούχου υπερβρωμιδίου (pyridinium bromide perbromide), το οποίο παρέχει ένα σταθερό διάλυμα και δεν απαιτεί περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας. Οι μέθοδοι βρωμίωσης έχουν ευρεία εφαρμογή και έχουν ενσωματωθεί σε μια σειρά από μεθόδους. Αυτές περιλαμβάνουν τον καθορισμό των αφλατοξινών στο φιστικοβούτυρο, στην πάστα φιστικιού, πάστα σύκου, πάπρικα σε σκόνη (Stroka και συν., 2000a), παιδικές τροφές (Stroka και συν., 2001), πάστα φουντουκιού (Senyuva και συν., 2005), και στον αραβόσιτο (Brera και συν., 2007).

Η φωτοχημική παραγωγοποίηση είναι μια εναλλακτική και περισσότερο οικονομική μέθοδος σε σύγκριση με τη μέθοδο post-column. Οι διαλύτες της κινητής φάσης διεγείρονται φωτοχημικά με τη χρήση UV ακτινοβολίας, και οι AFB₁ και AFG₁ ενυδατώνονται και μετατρέπονται στις αντίστοιχες ημιακετάλες τους. Μια πρόσφατη σύγκριση αυτής της μεθόδου με το ηλεκτροχημικό σύστημα παραγωγής Kobra cell και τη μέθοδο ιωδίου σε φιστίκια και αραβόσιτο, έδειξε ότι οι μέθοδοι ήταν αναλυτικά

ισοδύναμες για τα φιστίκια, αλλά έδωσε μια ελαφρώς αυξημένη απόκλιση για τον αραβόσιτο (Waltking και συν., 2006).

Η ενίσχυση του φθορισμού των αφλατοξινών μπορεί επίσης να επιτευχθεί χωρίς χημική παραγωγοποίηση, με την ενσωμάτωση των κυκλοδεξτρινών (CDs) στην κινητή φάση (Maragos και συν., 2008). Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από πολλαπλές υπομονάδες της γλυκόζης. Οι κυκλοδεξτρίνες δημιουργούν σύμπλοκα με τις αφλατοξίνες B₁ και G₁, τα οποία αυξάνουν το φθορισμό. Έχει αναπτυχθεί μια μέθοδος HPLC στην οποία οι βήτα-κυκλοδεξτρίνες ή οι ηλέκτρυλο-κυκλοδεξτρίνες προστέθηκαν στην κινητή φάση νερού-μεθανόλης (Chiavaro και συν., 2001). Ο φθορισμός των AFB₁ και AFG₁ ενισχύθηκε σημαντικά στο χρωματογράφημα HPLC, ενώ ο φθορισμός των AFB₂ και AFG₂ και ο χρόνος διατήρησης όλων των αφλατοξινών μεταβλήθηκε ελάχιστα.

4.2.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με άλλους τύπους ανίχνευσης

Σε σύγκριση με τη φασματομετρία μάζας και την ανίχνευση φθορισμού, οι υπόλοιπες διαθέσιμες τεχνικές ανίχνευσης στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιούνται σπάνια στην ανάλυση των μυκοτοξινών. Οι λόγοι μπορεί να είναι τα υψηλότερα όρια ανίχνευσης τα οποία είναι ακατάλληλα για ίχνη των καθοριζόμενων ουσιών και η έλλειψη εξειδίκευσης για ορισμένους ανιχνευτές. Οι Nielsen και Smedsgaard δημοσίευσαν μια μεγάλη βάση δεδομένων ανάλυσης 474 διαφορετικών μυκοτοξινών με φασματομετρία μάζας και απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας UV (Nielsen και συν., 2003). Οι περισσότερες μυκοτοξίνες δεν απορροφούν στο υπεριώδες (οι περισσότερες τριχοθεσίνες, φουμονισίνες) ή απορροφούν μόνο σε μη εξειδικευμένα μήκη κύματος των 200-225 nm (ωχρατοξίνες, ανάλογα ζεαραλενόνης) (Nielsen και συν., 2003). Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι ανίχνευσης με ταυτόχρονη ανίχνευση υπεριώδους και φθορισμού των τριχοθεσινών τύπου B, της ωχρατοξίνης A και της ζεαραλενόνης (Pussemier και συν., 2006).

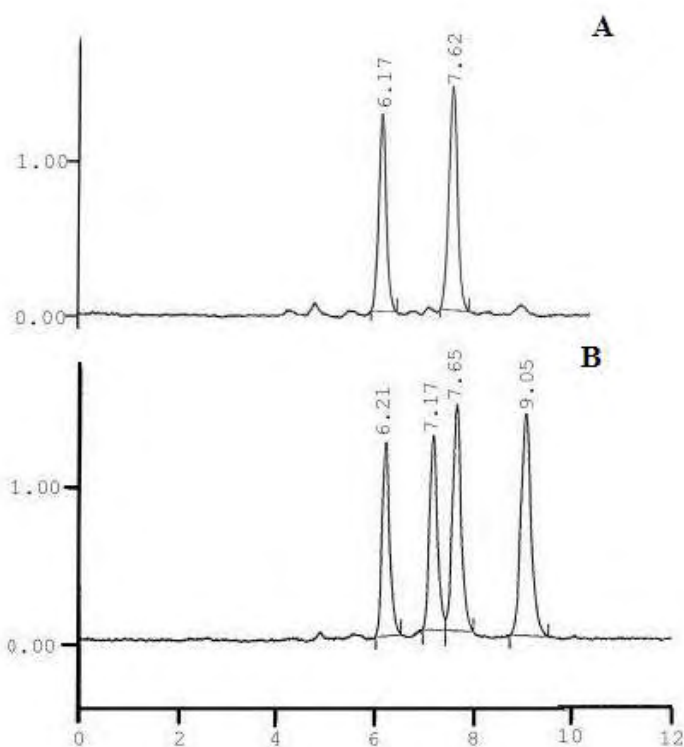
Καλύτερη ευαισθησία για τις τριχοθεσίνες B μπορεί να επιτευχθεί μέσω ηλεκτροχημικής ανίχνευσης στην αναγωγική κατάσταση ή με παραγωγοποίηση με νιτροβενζοϊκό χλώριο και ανίχνευση υπεριώδους στα 254 nm (Langseth και συν., 1998), και για τη ζεαραλενόνη και τους μεταβολίτες της, στα 236 nm (Llorens και συν., 2002). Η αμπερομετρία αποτελεί εναλλακτικό τρόπο ανίχνευσης (Zouagha και συν., 2008). Οι φουμονισίνες δεν απορροφούν στην υπεριώδη ακτινοβολία, αλλά στην

ανάλυσή τους έχει εφαρμοστεί ανίχνευση σκέδασης φωτός (ELSD – Evaporative Light Scattering Detection) (Wang και συν., 2008).

Η ωχρατοξίνη Α, η οποία αναλύεται συστηματικά με τη μέθοδο HPLC-FL, μπορεί επίσης να ανιχνευθεί με UV στα 333 nm.

Η πατουλίνη είναι μια μυκοτοξίνη που αναλύεται επιτυχώς με την HPLC (ανάστροφης φάσης) με ανίχνευση υπεριώδους, λόγω της ισχυρής της απορρόφησης στο υπεριώδες (276 nm) (Nielsen και συν., 2003). Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στο διαχωρισμό της πατουλίνης από την 5'-υδροξυμεθυλοφουρφυράλη, ουσία μη μυκητιακής προέλευσης, που προκαλεί αλλοιώσεις στους χυμούς φρούτων (Gökmen και συν., 1999).

Το κυκλοπιαζονικό οξύ παρουσιάζει ισχυρή απορρόφηση υπεριώδους στα 280 nm. Ο διαχωρισμός και το σχήμα της κορυφής παρουσιάζει προβλήματα, λόγω της όξινης φύσης της ουσίας, και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται στήλη C18 με βαθμονόμηση του διαλύτη που περιέχει ZnSO_4 (Hayashi και συν., 2005).



Εικόνα 4.5. Α. Χρωματογράφημα των αφλατοξινών G_2 , G_1 , B_2 , B_1 , χωρίς τη χρήση UV ακτινοβολίας. Μόνο οι αφλατοξίνες G_2 και B_2 ανιχνεύονται στους χρόνους 6,17 και 7,62 λεπτά, αντίστοιχα. Β. Χρωματογράφημα των αφλατοξινών G_2 , G_1 , B_2 , B_1 με τη χρήση UV ακτινοβολίας. Χρόνοι συγκράτησης: 6,21, 7,17, 7,65, 9,05 λεπτά αντίστοιχα (<http://www.aura-inc.com/aflatoxins.html>)

4.2.4 Αέριος χρωματογραφία (GC)

Η αέριος χρωματογραφία (GC - Gas Chromatography), χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των μυκοτοξινών σε ποικίλα δείγματα τροφίμων. Η σύγχρονη αέριος χρωματογραφία συνδυάζει τον ανώτερο διαχωρισμό στις τριχοειδείς στήλες με μια ποικιλία γενικών και ειδικών ανιχνευτών. Το προφανές μειονέκτημα, σε σύγκριση με την υγρή χρωματογραφία, είναι το γεγονός ότι μπορούν να αναλυθούν μόνο οι θερμικά σταθερές και οι πτητικές ουσίες, αν και αυτό το πρόβλημα μπορεί να λυθεί εν μέρει με την παραγωγοποίηση. Οι περισσότερες μυκοτοξίνες δεν είναι πτητικές και κατά συνέπεια πρέπει να παραγωγοποιούνται αρχικά για ανάλυση με GC (Scott και συν., 1995). Αρκετές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για την παραγωγοποίηση των μυκοτοξινών, μεταξύ των οποίων η σιλυλίωση και η πολυφθοροακυλίωση (Scott και συν., 1995). Ωστόσο, οι μυκοτοξίνες ως μεγάλα πολικά μόρια, αναλύονται καλύτερα με τις μεθόδους υγρής χρωματογραφίας σε σύγκριση με την αέρια χρωματογραφία. Από τις δημοσιευμένες μεθόδους αέριας χρωματογραφίας επικρατούν εκείνες που αναπτύχθηκαν για τις τριχοθεσίνες και άλλες τοξίνες Fusarium (Langseth και συν., 1998).

Προφανές πλεονέκτημα αποτελεί ο συνδυασμός με φασματομετρία μάζας, διότι μπορεί να επιβεβαιωθεί η ταυτότητα των ενώσεων (Onji και συν., 1998), η οποία είναι ιδιαίτερα σημαντική στην ανάλυση των μεταβολιτών (Langseth και συν., 1998). Η εισαγωγή αλογονομένων ομάδων στο μόριο, το καθιστά ανιχνεύσιμο με τη χρήση ανιχνευτή δέσμησης ηλεκτρονίων (ECD - Electrochemical Detector), ο οποίος είναι εξαιρετικά επιλεκτικός και ευαίσθητος (Langseth και συν., 1998). Επιπλέον, χρησιμοποιούνται ανιχνευτές ιονισμού φλόγας (FID - Flame Ionization Detection) (Schothorst και συν., 2001), και πιο συχνά φασματόμετρο μάζας (MS) με ιονισμό με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Onji και συν., 1998) ή χημικό ιονισμό (Schollenberger και συν., 1998).

Για τις φουμονισίνες, το πρωτόκολλο περιλαμβάνει υδρόλυση των όξινων πλευρικών αλυσίδων και επανεστεροποίηση ή ακυλίωση του υπόλοιπου αμινοπολυολίου. Τα παράγωγα υποβλήθηκαν σε GC-MS ανάλυση, αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά (Wilkes και συν., 1998).

Όπως και με άλλες μυκοτοξίνες, η ωχρατοξίνη Α δεν μπορεί να προσδιοριστεί απευθείας με GC, δεδομένου ότι δεν είναι πτητική.

Οι τριχοθεσίνες προσδιορίστηκαν σε χημειοταξονικές μελέτες των Fusarium, Stachybotrys, Trichoderma και Memnoniella, μέσω παραγωγοποίησης με πενταφθοροπροπιονικό ανυδρίτη (Nielsen και συν., 2001). Με την GC-MS

αναλύθηκαν ταυτόχρονα τέσσερις ενώσεις στο σιτάρι. Οι πτητικοί μεταβολίτες μετρήθηκαν ως δείκτες της μυκητιακής μόλυνσης (Olsson και συν., 2002).

Τα δείγματα αξιολογήθηκαν για την εργοστερόλη, την ωχρατοξίνη Α και DON. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι είναι δυνατό να μετρηθούν τα επίπεδα της ωχρατοξίνης Α κάτω από το ανώτατο όριο των 5 mg/kg για το σιτάρι. Παρά την καλή απόδοση, η αέριος χρωματογραφία παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα, όπως ότι τα δείγματα που αναλύονται είναι μόνο τα πτητικά ή και αυτά που μπορούν να μετατραπούν σε πτητικά. Επιπλέον, η θερμική σταθερότητα αποτελεί ένα επιπλέον πρόβλημα διότι η θέρμανση μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση των δειγμάτων.

4.2.5 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) και άλλες μέθοδοι χρωματογραφίας

Η συγκεκριμένη μέθοδος αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε κυρίως πριν από την ανάπτυξη των μεθόδων HPLC και LC-MS. Πλεονέκτημα της TLC (Thin Layer Chromatography) είναι η ποικιλία σταθερών και κινητών φάσεων, καθώς και μια σειρά από παράγοντες ψεκασμού που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση (Lin και συν., 1998). Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας δύο διαστάσεων και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC – High Performance Thin Layer Chromatography) αποτελούν εναλλακτικές μεθόδους για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό και προσδιορισμό των αφλατοξινών (Papp και συν., 2002). Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), είναι μια χαμηλού κόστους, γρήγορη αναλυτική τεχνική, παράγοντας ποιοτικές ή ημι-ποσοτικές εκτιμήσεις με οπτικό έλεγχο, αλλά και αξιόπιστα ποσοτικά αποτελέσματα, με πυκνομετρικές μετρήσεις (Lin και συν., 1998). Το διάλυμα του δείγματος μεταφέρεται σε πλάκα λεπτής στιβάδας (στατική φάση). Η πλάκα τοποθετείται σε ένα δοχείο όπου βρίσκεται το υγρό μέσο (κινητή φάση). Εξαιτίας των τριχοειδών δυνάμεων η κινητή φάση κινείται προς τα πάνω, και έτσι κινούνται οι προς διαχωρισμό ουσίες. Μετά από μία σειρά φαινομένων προσρόφησης στη στατική φάση, εμφανίζεται μια διαφορετική ταχύτητα κίνησης των ουσιών, με τελικό αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους. Ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της προσρόφησης των ουσιών στην επιφάνεια της στατικής φάσης, καθώς επίσης και της κατανομής μεταξύ του δεσμευμένου ύδατος του προσροφητή και της κινητής φάσης. Παραδοσιακά, η πιο δημοφιλής μέθοδος που χρησιμοποιείται για τις μυκοτοξίνες είναι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC, η οποία προσφέρει τη δυνατότητα ελέγχου μεγάλου αριθμού δειγμάτων με χαμηλό κόστος. Η χρήση της TLC για την ανάλυση των μυκοτοξινών εξακολουθεί να είναι δημοφιλής για τον ποσοτικό

και ημι-ποσοτικό προσδιορισμό. Αυτό οφείλεται στην υψηλή της απόδοση, στο χαμηλό λειτουργικό κόστος, και στην ευκολία της αναγνώρισης των ενώσεων-στόχων, με την UV-VIS φασματική ανάλυση. Η πηκτική διοξειδίου του πυριτίου αποτελεί ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα υποστρώματα της TLC (Yu και συν., 1991).

Το είδος του καθαρισμού εξαρτάται από τις ιδιότητες και το είδος της ως προς μελέτη τοξίνης.

Υπάρχουν μελέτες που χρησιμοποίησαν στήλες από πηκτική διοξειδίου του πυριτίου για τον καθαρισμό των μυκοτοξινών (Roch και συν., 1995), και C2, C8, C18 και συνδεδεμένες με το pH φάσεις, για τις αφλατοξίνες του αραβόσιτου (Tomlins και συν., 1989). Για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών σε διάφορα υποστρώματα τροφίμων χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας σε συνδυασμό με τις στήλες ανοσοσυγγένειας (Stroka και συν., 2000b). Η ποσοτικοποίηση των αφλατοξινών έγινε με πυκνομετρία.

Ο προσδιορισμός της ωχρατοξίνης Α με την TLC συγκρίθηκε με διαφορετικές μεθόδους HPLC. Η απόδοση της μεθόδου TLC ήταν αρκετά μικρότερη από το μέσο όρο των μεθόδων HPLC (Ahmed και συν., 2007). Ο Dawlatana και οι συνεργάτες του (1996), αναφέρουν μια σειρά σταδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό της ωχρατοξίνης Α από το ρύζι και την ποσοτικοποίηση της με φθορισμό. Αυτή η μέθοδος απαιτεί μεγάλες ποσότητες διαλύτη, εντατικές εργαστηριακές διαδικασίες, και χαρακτηρίζεται από έλλειψη αυτοματισμού. Η TLC έχει αναφερθεί ότι έχει χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της αλλοίωσης των καρυδιών από μούχλα, τα οποία πωλούνται στο εμπόριο σε καναδικά παντοπωλεία (Overy και συν., 2003). Τρεις κυρίαρχοι μυκοτοξιγενείς μύκητες των δειγμάτων ήταν οι *P. crustosum*, *P. glabrum/spinulosum* και *P. discolor*.

Η TLC χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της οιστρόνης, της οιστραδιόλης, της διαιθυλοστιλβεστρόλης (DES), της ζεαραλανόλης (ζερανόλη), της ζεαραλανόνης (ZON) και της ζεαραλενόλης (ZEL) (Medina και συν., 1992). Η TLC έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των τριχοθεσινών σε δημητριακά και ζωοτροφές (Sokoloni και συν., 2006). Το όριο ανίχνευσης (LOD – Limit Of Detection) για τους παραπάνω εστέρες κυμάνθηκε μεταξύ 30 και 50 ng ανά έγχυση.

Αυτή η μέθοδος θα μπορούσε να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για την *in vivo* φαρμακοκινητική ανάλυση των τριχοθεσινών. Ο προσδιορισμός των τριχοθεσινών απαιτεί απεικόνιση με αντιδραστήρια ψεκασμού (νιτροβενζυλπυριδίνη και χλωριούχο αλουμίνιο) (Ostry και συν., 2000).

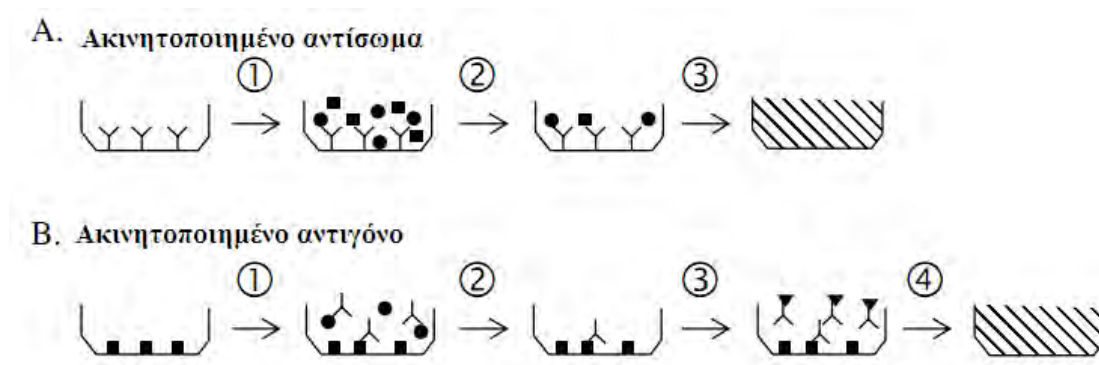
Τα τελευταία χρόνια δεν παρατηρείται εξέλιξη στις μεθόδους TLC για την πατουλίνη.

4.2.6 Τριχοειδείς ηλεκτροφορητικές μέθοδοι

Οι τεχνικές τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης, παρ' όλο που μπορούν να προσδιορίσουν τις ίδιες ουσίες με τους ίδιους ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην HPLC, δεν είναι τόσο διαδεδομένες όσο οι τελευταίες. Πιθανή εξήγηση αποτελούν τα καλύτερα όρια ανίχνευσης και η μεγαλύτερη ευχρηστία των μεθόδων HPLC. Οι μυκοτοξίνες που προσδιορίζονται με την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση είναι εκείνες στις οποίες χρησιμοποιείται η ανίχνευση φθορισμού (FL). Η ωχρατοξίνη Α καθορίστηκε με σήμανση φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ (LIF) σε ανθρώπινο ορό (Köller και συν., 2006), σε δείγματα τροφίμων μετά από καθαρισμό ανοσοσυγγενείας (Corneli και συν., 1998), και στο κρασί μετά την απομόνωση, σε συνδυασμό με την εκχύλιση στερεάς φάσης (Almeda και συν., 2008).

4.3 Ανοσοχημικές μέθοδοι

Σήμερα είναι διαθέσιμη μια ποικιλία ανοσολογικών δοκιμασιών που χρησιμοποιούνται στον ποσοτικό προσδιορισμό των αφλατοξινών σε διάφορα τρόφιμα και στις ζωοτροφές.



Εικόνα 4.6. Απεικόνιση δύο μορφών ανοσολογικών δοκιμασιών με τη χρήση, είτε ακίνητοποιημένων αντισωμάτων, είτε ακίνητοποιημένων αντιγόνων. (Α) με το ακίνητοποιημένο αντίσωμα (Y), τα βήματα είναι (1) προσθήκη του δείγματος (τοξίνη: ●) και του ενζύμου της τοξίνης (■) και επώαση, (2) ακολουθεί πλύση για την αφαίρεση του αδέσμευτου συμπλόκου και (3) προσθήκη του υποστρώματος, επώαση και μέτρηση του χρωματισμένου προϊόντος. (Β) Με ακίνητοποιημένο αντιγόνο (■), τα βήματα είναι (1) προσθήκη του δείγματος (τοξίνη: ●) και του αντισώματος έναντι της τοξίνης (Y) και επώαση, (2) ακολουθεί πλύση για την απομάκρυνση του αδέσμευτου αντισώματος, (3) προσθήκη του δεύτερου αντισώματος συζευγμένου με υπεροξειδάση

(Y ▼) και επώασης και (4) πλύση για την απομάκρυνση του αδέσμευτου συμπλόκου, προσθήκη του υποστρώματος, επώαση και μέτρηση του χρωματισμένου προϊόντος.

4.3.1 Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική μέτρηση (ELISA)

Οι Kolosova και συνεργάτες (2006) ανέπτυξαν μια άμεσα ανταγωνιστική τεχνική (ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, για τον προσδιορισμό της αφλατοξίνης B₁ σε δείγματα δημητριακών. Μετά την απομόνωση των δειγμάτων ακολούθησε η επίστρωσή τους σε ειδικά τριβλία. Οι συγκεντρώσεις κυμαίνονταν από 0,1 έως 10 µg / kg. Σε δείγματα ρυζιού επιτεύχθηκε μια ανάκτηση της τάξεως του 94%, με LOD το 0,05 µg/kg (Kolosova και συν., 2006). Οι Razzazi και συν. (Razzazi-Fazeli και συν., 2004) σύγκριναν τη μέθοδο ELISA με την HPLC σε δείγματα φιστικιών και καλαμποκιού, τα οποία αναλύθηκαν και με τις δύο μεθόδους. Επιλέχθηκαν τριάντα μολυσμένα δείγματα και αναλύθηκαν με τις στήλες ανοσοσυγγένειας πριν τη χρήση της χρωματογραφίας HPLC-FLD. Μεγαλύτερη συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της HPLC-FLD και της ELISA (0,9244 έναντι 0,7590 για το σύνολο των αφλατοξινών) στα χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης (0-80 µg/kg), από ό, τι σε υψηλότερα επίπεδα, έως 400 µg/kg) (Razzazi-Fazeli και συν., 2004). Ο Trucksess και οι συνεργάτες του δοκίμασαν μία τροποποιημένη μέθοδο ELISA σε 15 εργαστήρια (Trucksess και συν., 1994), σε δείγματα που περιείχαν αφλατοξίνες, σε συγκεντρώσεις 10, 20 και 30 µg/kg. Τα αποτελέσματα της έρευνας ήταν αληθώς θετικά σε πολύ υψηλό ποσοστό, χωρίς καθαρισμό (Trucksess και συν., 1994). Μόνο ένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα καταγράφηκε. Οι ερευνητές υποστήριζαν ότι αυτή η δοκιμή αποτελεί μια ταχεία τεχνική ελέγχου σε επίπεδα αφλατοξινών 20 µg/kg (Trucksess και συν., 1994). Ο Chun και οι συνεργάτες του επαλήθευσαν τα προσδιορισμένα με ELISA επίπεδα των αφλατοξινών σε 85 δείγματα ξηρών καρπών με HPLC (Chun και συν., 2007). Για την αφλατοξίνη B₁ το LOD (Limit Of Detection) ήταν 0,08 µg/kg και το LOQ (Limit Of Quantification) ήταν 0,15 µg/kg, αντίστοιχα. Η ανάκτηση των δειγμάτων κυμαινόταν από 83,4 έως 102% για όλες τις αφλατοξίνες. Μετά τον έλεγχο με ELISA, 31 θετικά δείγματα, τα οποία έδωσαν αποτελέσματα πάνω από 0,06 µg/kg, προσδιορίστηκαν ποσοτικά με HPLC, ενώ σε εννέα δείγματα βρέθηκαν επίπεδα μόλυνσης έως 28 µg/kg (Chun και συν., 2007). Η HPLC ανάλυση έδειξε ότι η ELISA έδωσε ψευδώς θετικά αποτελέσματα στα 2/3 των δειγμάτων. Το μειονέκτημα της ELISA είναι η πιθανότητα εμφάνισης ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, λόγω

διασταυρούμενων αντιδράσεων των αντισωμάτων (Chun και συν., 2007). Ένα μεγάλο πλεονέκτημα των τεχνικών ELISA είναι η υψηλή απόδοση, ενώ οι νέες ποιοτικές / ημιποσοτικές τεχνικές επιτρέπουν την ταχύτερη ανίχνευση, οι οποίες σχετίζονται με την απώλεια ακρίβειας. Ως εκ τούτου, οι τεχνικές ELISA είναι κατάλληλες για την διαλογή των δειγμάτων για την παρουσία αφλατοξινών και τα θετικά δείγματα πρέπει να επιβεβαιώνονται με HPLC-FLD.

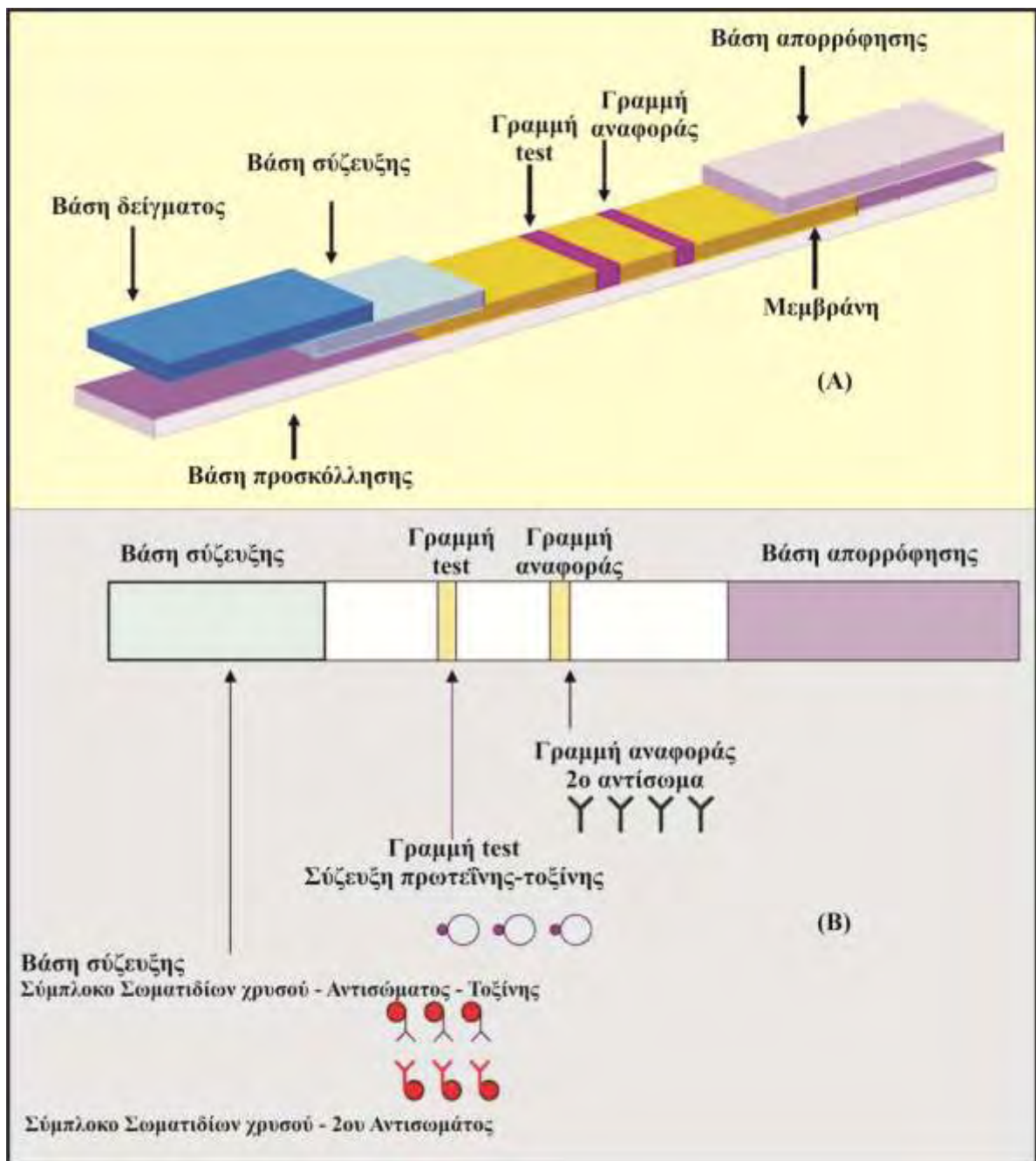
4.3.2 Ανοσοδιήθηση

Ο Pal και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν νέες εξελίξεις που βασίζονται στην τεχνική της ανοσοδιήθησης. Η μέθοδος της ανοσοδιήθησης αποτελείται από μια μεμβράνη επικαλυπτόμενη με αντισώματα έναντι της αφλατοξίνης B₁, και επιτρέπει τον προσδιορισμό των λιγότερο αραιωμένων δειγμάτων (Pal και συν., 2005). Μετά την εφαρμογή των δειγμάτων στα σημεία (spots), ακολούθησε το στάδιο των πλύσεων για την απομάκρυνση των συστατικών του υποστρώματος. Οι κηλίδες απεικονίστηκαν με τη χρήση αντισώματος έναντι της αφλατοξίνης B₁ συζευγμένης με την υπεροξειδάση HRP. Η μέση ανάκτηση σε ένα εύρος των 5-100 μg/kg ήταν 99-105%. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε αράπικα φιστίκια, καλαμπόκι, σιτάρι, σόγια, τσίλι και ζωοτροφές πουλερικών (Pal και συν., 2005). Επιπλέον, οι Pal και Dhar δημοσίευσαν μία μελέτη ημι-ποσοτικού προσδιορισμού της αφλατοξίνης B₁ σε μία παρτίδα δειγμάτων, βασιζόμενη στις ανοσολογικές τεχνικές (Pal και Dhar, 2004). Η συγκεκριμένη ανοσολογική μέθοδος αποτελείται από μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης συνδεδεμένη με πολυαιθυλένιο. Η ένταση του χρώματος των απομονωμένων δειγμάτων συγκρίθηκε με την ένταση των προτύπων διαλυμάτων. Ο έλεγχος επιτρέπει την ανάλυση 12 δειγμάτων μέσα σε 10 λεπτά. Οι μέσες ανακτήσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 91 και 104%, με LOD το 0,01 ng/mL. Οι ερευνητές ανέφεραν καλή συσχέτιση μεταξύ της ανοσολογικής μεθόδου και της HPLC στη σύγκριση των μολυσμένων δειγμάτων ($R^2 = 0,99$) (Pal και Dhar, 2004).

4.3.3 Ταινία βαθμονόμησης πλευρικής ροής (Lateral flow dipstick)

Η ταινία βαθμονόμησης πλευρικής ροής αποτελεί ένα νέο τύπο ανοσολογικής δοκιμασίας, η οποία βασίζεται στο σχηματισμό συμπλόκου αντιγόνου- αντισώματος. Στους ελέγχους πλευρικής ροής, το δείγμα τοποθετείται πάνω σε ένα επίθεμα, όπου οι μυκοτοξίνες προσδένονται σε σωματίδια χρυσού - αντισωμάτων. Τα σωματίδια χρυσού του πρώτου και του δεύτερου αντισώματος (συζευγμένου με υπεροξειδάση)

μεταναστεύουν στη ζώνη ελέγχου, η οποία περιέχει μια μεμβράνη. Το σύμπλοκο σωματιδίου χρυσού - αντισώματος της μυκοτοξίνης προσδένεται στη ζώνη ελέγχου σε μια πρωτεΐνη αφλατοξίνης, ενώ το δεύτερο σύμπλοκο αντισώματος προσδένεται στη ζώνη ελέγχου που επιτρέπει το σχηματισμό μιας έγχρωμης ζώνης. Εάν η συγκέντρωση των αφλατοξινών είναι ίση ή μεγαλύτερη από τα καθορισμένα επίπεδα, εμφανίζεται στη ζώνη ελέγχου μια έγχρωμη γραμμή. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μεθόδου λαμβάνονται σε σύντομο χρονικό διάστημα (3-5 λεπτά). Οι ανοσοχημικές μέθοδοι για την ταχεία ανίχνευση των αφλατοξινών περιγράφηκαν πρόσφατα από τον Goryacheva και τους συνεργάτες του (Goryacheva και συν., 2007). Αυτό το είδος της τεχνικής αποτελεί μια σημαντική στρατηγική για τον έλεγχο των μολυσμένων τροφίμων και των ζωοτροφών. Ωστόσο, τα θετικά αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται με πιο περίπλοκες μεθόδους.



Εικόνα 4.7. Βασική αρχή ταινίας βαθμονόμησης πλευρικής ροής

4.3.4 Ανοσολογική δοκιμασία πόλωσης φθορισμού (FP)

Μία άλλη σημαντική ανοσοχημική μέθοδος για την ταχεία ανίχνευση μυκοτοξινών βασίζεται στην πόλωση φθορισμού (FP - Fluorescence Polarization immunoassay). Όσον αφορά στη μέθοδο αυτή, δεν απαιτείται βήμα καθαρισμού και τα αποτελέσματα μπορούν να ληφθούν μέσα σε λίγα λεπτά. Έχουν δημοσιευτεί μελέτες για την ανίχνευση των αφλατοξινών στο σιτάρι (Shim και συν., 2004) και στο καλαμπόκι (Chun και συν., 2009). Η ανοσολογική δοκιμασία της πόλωσης φθορισμού έχει περιγραφεί για έναν

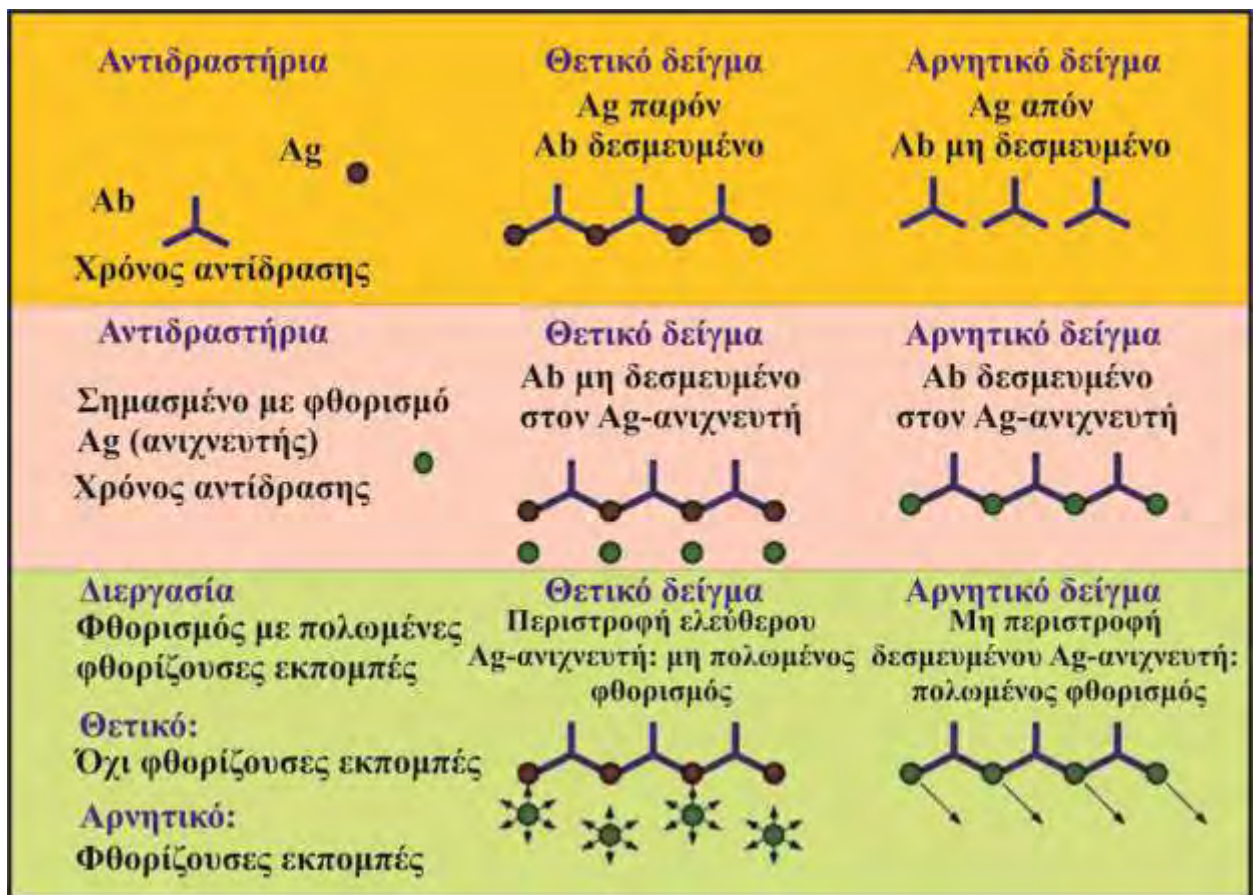
αριθμό μυκοτοξινών, συμπεριλαμβανομένων των αφλατοξινών και των φουμονισινών (Nasir και συν., 2003). Οι ανιχνευτές της πόλωσης φθορισμού μετρούν έμμεσα το ρυθμό περιστροφής ενός φθορισμοφόρου σε διάλυμα. Ο ρυθμός περιστροφής σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος των μορίων, με μεγαλύτερα μόρια που περιστρέφονται πιο αργά σε μία θερμοκρασία.

Επίσης, χρησιμοποιείται ένας ανιχνευτής μυκοτοξίνης-φθορισμοφόρου, μικρού μοριακού βάρους, και περιστρέφεται γρήγορα σε διάλυμα. Η προσθήκη αντισωμάτων αντιτοξίνης οδηγεί στον σχηματισμό ενός ανοσοσυμπλέγματος του ανιχνευτή με το αντίσωμα, επιβραδύνοντας αποτελεσματικά το ρυθμό περιστροφής του φθορισμοφόρου και αυξάνοντας την πόλωση. Η ανοσολογική αυτή μέθοδος επιτρέπει συνεπώς την ανίχνευση μορίων χαμηλού μοριακού βάρους σε διάλυμα, χωρίς τη μεσολάβηση βημάτων διαχωρισμού των δεσμευμένων από τα αδέσμευτα μόρια, το οποίο αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα έναντι των παραδοσιακών τεχνικών ELISA. Όπως και με άλλες ανοσολογικές δοκιμασίες, είναι απαραίτητη η επιλογή του κατάλληλου αντισώματος και του ανιχνευτή. Οι ανοσολογικές δοκιμασίες της πόλωσης φθορισμού διεξάγονται με τη χρήση του συντελεστή συσχέτισης (κινητικές δοκιμασίες) ή το τελικό σημείο του ισορροπημένου μείγματος (αναλύσεις εξισορρόπησης). Ο χρόνος που χρειάζεται για τον συνδυασμό αντισώματος / ανιχνευτή / τοξίνης με την επίτευξη ισορροπίας είναι μια κρίσιμη πτυχή των ανοσολογικών δοκιμασιών της πόλωσης φθορισμού. Ο χρόνος ισορροπίας ποικίλει από 1 λεπτό μέχρι 15 λεπτά, ανάλογα με τον επιλεγμένο συνδυασμό αντισωμάτων / ανιχνευτή.

4.3.5 Βιοαισθητήρας συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων

Μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογία για την ταχεία ανίχνευση των μυκοτοξινών είναι ο βιοαισθητήρας συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (surface plasmon resonance biosensor). Η αρχή του συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων βασίζεται στην ανίχνευση της αλλαγής του δείκτη διάθλασης του μέσου, όταν η αναλυόμενη ουσία συνδέεται με ένα ακινητοποιημένο αντίσωμα. Ο αριθμός των μορίων της ουσίας που συνδέεται με τα αντισώματα σε ένα λεπτό μεταλλικό στρώμα συσχετίζεται με τη μεταβολή της γωνίας συντονισμού (Zheng και συν., 2006). Η τεχνική έχει πρόσφατα χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της αφλατοξίνης M_1 (Wang και συν., 2009), για τη φουμονισίνη B_1 (Cho και συν., 2005), καθώς και για την ανάλυση πολυ-μυκοτοξινών, που καλύπτει την ανάλυση της αφλατοξίνης B_1 , της ωχρατοξίνης A, της φουμονισίνης B_1 και της DON, σε 25 λεπτά (Van der Gaag και συν., 2003). Η εφαρμογή αυτή έχει

αρκετά πλεονεκτήματα, όπως οι μικροί όγκοι δείγματος (μl) και επαναχρησιμοποιούμενα μεταλλικά chips (Zheng και συν., 2006). Οι εφαρμογές που βασίζονται σε μη οργανικά αντισώματα είναι σε δοκιμές πλευρικής ροής ή συνεχούς ροής. Σε αντίθεση με τις μεθόδους ELISA, αυτές οι εφαρμογές χρησιμοποιούν αντιγόνα ή αντισώματα που είναι ακινητοποιημένα σε μεμβράνες μεταφοράς, αντί των πλακών μικροτιτλοδότησης, είναι λιγότερο χρονοβόρες και παρέχουν αποτελέσματα μετά από λίγα λεπτά.



Εικόνα 4.8. Ανοσολογική δοκιμασία πόλωσης φθορισμού. Mycopathologia (2006) 161: 261–273

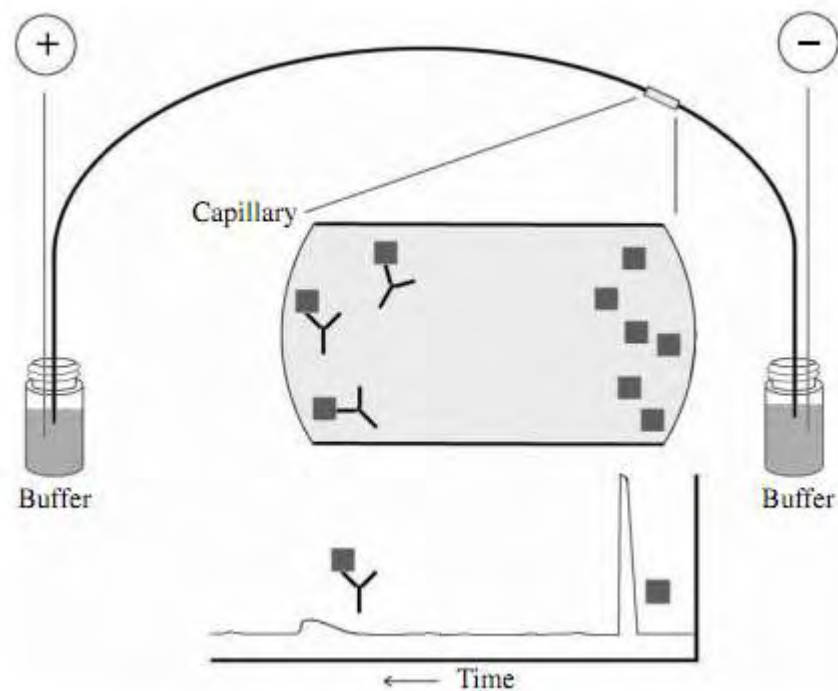
4.3.6 Τριχοειδής ηλεκτροφορητικός ανοσοπροσδιορισμός (CE)

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE - Capillary Electrophoresis) χρησιμοποιείται ως χρωματογραφική τεχνική στην οποία οι μυκοτοξίνες διαχωρίζονται και από τα συστατικά του υποστρώματος χρησιμοποιώντας ηλεκτρικό δυναμικό. Όταν χρησιμοποιείται ως χρωματογραφική μέθοδος, οι τοξίνες απομονώνονται από δείγματα τροφίμων με τη χρήση μεθόδων καθαρισμού, ανάλογων στην HPLC, και τα

εκχυλίσματα εγχέονται στα τριχοειδή. Μετά το διαχωρισμό σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, ανιχνεύονται οι αναλυόμενες ουσίες, συνήθως με τη χρήση φθορισμού ή υπεριώδους απορρόφησης. Οι πρόσφατες εξελίξεις στην ανίχνευση μυκοτοξινών με την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση περιλαμβάνουν τη χρήση των β-κυκλο-δεξτρινών, σε συνδυασμό με τη διέγερση πολυφωτονίων για την ανίχνευση της αφλατοξίνης (Wei και συν., 2000), και την ανίχνευση της πατουλίνης στο χυμό μήλου με την υπεριώδη ακτινοβολία (Tsao και συν., 2000). Η μικυλλιακή ηλεκτροκινητική τριχοειδής χρωματογραφία (MECC) είναι μια παραλλαγή της ηλεκτροφόρησης τριχοειδούς ζώνης η οποία συμβάλλει κυρίως στην ανίχνευση ουδέτερων ενώσεων, όπως είναι οι αφλατοξίνες. Μια μέθοδος που βασίζεται στην μικυλλιακή ηλεκτροκινητική τριχοειδή χρωματογραφία χρησιμοποιεί μια ηλεκτρονικά ελεγχόμενη διαδικασία έγχυσης (σε αντίθεση με την ηλεκτροκινητική έγχυση) για τη μέτρηση πρότυπων διαλυμάτων αφλατοξινών (Dickens και συν., 2000). Τα αναφερόμενα όρια ανίχνευσης για τις αφλατοξίνες σε ρυθμιστικό διάλυμα κυμαίνονταν από 7,2 nM (2,3 ng/mL), για την AFB₂ έως 31 nM (10 ng/mL) για την AFG₁. Ο συνδυασμός της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης με ανοσοπροσδιορισμό έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των φουμονισινών στον αραβόσιτο (Maragos και συν., 1997). Μετά την εκχύλιση του καλαμποκιού με νερό, ένα μέρος του εκχυλίσματος αναμείχθηκε με αντίσωμα και φθορίζουσα φουμονισίνη (ανιχνευτής). Η φουμονισίνη στο δείγμα ανταγωνίζεται με τον ανιχνευτή για την πρόσδεση στο αντίσωμα. Η εφαρμογή της τάσης οδηγεί σε διαχωρισμό του δεσμευμένου και μη δεσμευμένου ανιχνευτή. Με την αύξηση της φουμονισίνης στο δείγμα, τα επίπεδα του δεσμευμένου ανιχνευτή μειώθηκαν, και τα επίπεδα του μη δεσμευμένου ανιχνευτή αυξήθηκαν, σηματοδοτώντας την παρουσία της τοξίνης. Οι αναλύσεις ήταν σχετικά ταχείες, χρησιμοποιώντας ένα 4-λεπτο βήμα ηλεκτροφόρησης και μία δύλεπτη πλύση των τριχοειδών μεταξύ των δειγμάτων.

Η ευαισθησία της μεθόδου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το βαθμό συγκέντρωσης των αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται. Στη βέλτιστη συγκέντρωση αντισωμάτων, το κεντρικό σημείο για τις καμπύλες βαθμονόμησης κυμάνθηκε από 500 έως 1700 ng AFB₁/mL. Δυστυχώς, αυτό το επίπεδο ευαισθησίας ήταν επαρκές μόνο για την ανάλυση δειγμάτων αραβόσιτου που περιείχαν σημαντικές συγκεντρώσεις AFB₁ (>10.000 ng/g). Η ευαισθησία σε αυτή τη μορφή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από τη συγγένεια των αντισωμάτων για τη φουμονισίνη και τον ανιχνευτή, υπό συνθήκες υψηλής έντασης ηλεκτρικού πεδίου, η οποία μπορεί να βελτιωθεί με τη χρήση ενός διαφορετικού αντισώματος φουμονισίνης.

Άλλες, λιγότερο ανεπτυγμένες, τεχνικές χρησιμοποιούν επίσης τα τριχοειδή, με στόχο την ανίχνευση πολλαπλών ουσιών (Narang και συν., 1998). Η βελτίωση της μικρορευστομηχανικής και της μικρογράφησης των συστατικών θα οδηγήσει στην ανάπτυξη των πολυκαναλικών αισθητήρων των μυκοτοξινών, χρησιμοποιώντας ένα πρότυπο δίκτυο αντισωμάτων, ακινητοποιημένων στην επιφάνεια ενός επίπεδου κυματοδηγού έτσι, ώστε να παγιδεύσουν τα αντιγόνα (μυκοτοξίνες) των προς ανάλυση δειγμάτων (Rowe-Taitt και συν., 2000).



Εικόνα 4.9. Σχηματική απεικόνιση τριχοειδούς ηλεκτροφορητικού ανοσοπροσδιορισμού. Το αντίσωμα (Y) προσδένεται στο δείγμα και σε σημασμένη με φθορισμό τοξίνη (ανιχνευτής: ■). Οι δεσμευμένοι και μη δεσμευμένοι ανιχνευτές διαχωρίζονται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Παρουσία ελεύθερων τοξινών, το ποσό του μη δεσμευμένου ανιχνευτή αυξάνεται και το ποσό του δεσμευμένου ανιχνευτή μειώνεται, μεταβάλλοντας τα σχετικά μεγέθη των δύο κορυφών.

5. ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

Η κατανάλωση αφλατοξινών που περιέχονται σε μολυσμένα τρόφιμα ή ζωοτροφές προκαλεί δηλητηρίαση γνωστή ως αφλατοξίκωση. Σε όλα τα μέρη του κόσμου έχουν αναφερθεί περιστατικά αφλατοξίκωσης, σε όλα σχεδόν τα οικόσιτα και μη οικόσιτα ζώα, όπως είναι τα βοοειδή, τα άλογα, τα κουνέλια, και άλλα μη ανθρώπινα πρωτεύοντα θηλαστικά. Επίσης, σε πολλά μέρη του κόσμου έχουν αναφερθεί περιστατικά αφλατοξίκωσης και σε ανθρώπους.

Η διατροφή είναι ο κύριος τρόπος μέσω του οποίου οι άνθρωποι καθώς και τα ζώα εκτίθενται σε αφλατοξίνες. Εκτός από την αφλατοξίνη AFB₁, που περιέχεται σε πολλά τρόφιμα, όπως ξηρούς καρπούς και μπαχαρικά, η έκθεση σε αφλατοξίνες μπορεί να λάβει χώρα μέσω της κατανάλωσης μολυσμένου γάλακτος που περιέχει αφλατοξίνη M₁ (μεταβολίτης της AFB₁). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι οι γεωργικοί εργάτες ή άτομα που εργάζονται σε ελαιοτριβεία και σιτοβολώνες εκτίθενται σε αφλατοξίνες (Sorenson και συν., 1984).

Παρά το γεγονός ότι οι αφλατοξίνες ήταν η αιτία πολλών θανάτων ζώων και ύποπτες σε ορισμένες περιπτώσεις θανάτου ανθρώπων, η επίδραση της κατανάλωσης αφλατοξίνης από μια ευρεία ποικιλία των ζωικών ειδών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, επεκτείνεται πολύ πέρα από ένα τέτοιο κομβικό σημείο. Η οικονομική σημασία αυτής της ομάδας τοξινών στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές φαίνεται μέσω της μειωμένης παραγωγικότητας, συμπεριλαμβανομένων του κρέατος και των αυγών, της μειωμένης αύξησης του σωματικού βάρους, της μείωσης της αποδοτικότητας των ζωοτροφών, της αυξημένης συχνότητας εμφάνισης ασθενειών λόγω της ανοσοκαταστολής και της καταστροφής ζωτικών οργάνων. Πολλές ανθρώπινες ασθένειες έχουν αναγνωρισθεί ως αποτέλεσμα έκθεσης σε αφλατοξίνες (Shank 1977· Krishnamachari και συν., 1975a, 1975b· Ngindu και συν., 1982).

Οι τρόποι δράσης και η πολλαπλότητα των επιδράσεων στον άνθρωπο και στα ζώα είναι αρκετά σύνθετα, και σε ορισμένες περιπτώσεις ασαφή, ώστε να υπάρχουν επαρκώς προληπτικά ή θεραπευτικά μέτρα για την αφλατοξίκωση.

5.1 Ιστορικό

Η τοξικότητα μιας ομάδας στενά συγγενικών ενώσεων, που ονομάζονται αφλατοξίνες, προσδιορίστηκε το 1960, μετά από μια από τις πιο εντατικές και παραγωγικές έρευνες άγνωστων τοξικών παραγόντων φυσικής προέλευσης. Τα εισαγόμενα φιστίκια από τη Βραζιλία στη Μεγάλη Βρετανία είχαν στοχοποιηθεί γρήγορα ως η αιτία των θανάτων

μεγάλου αριθμού γαλοπουλών και παπιών στα βρετανικά αγροκτήματα. Κατά τη διάρκεια της εξέτασης για την παρουσία των δηλητηριωδών φυτικών ειδών, παρατηρήθηκαν μυκητιακές υφές, παρόλο που οι προσπάθειες καλλιέργειας ήταν αρνητικές (Goldblatt, 1969).

Στη συνέχεια, το σύνδρομο της νόσου αναγνωρίστηκε τόσο σε άλλα κατοικίδια ζώα, όσο και σε περιοχές πέρα από τη Μ. Βρετανία. Ο μύκητας, *Aspergillus flavus*, που ήταν η κύρια αιτία εμφάνισης στην πράξη των ασθενειών των ζώων, απομονώθηκε από ζωοτροφή που σχετιζόνταν με το ηπατικό πρόβλημα που παρουσιάστηκε σε πάπιες στην Ουγκάντα (Sargeant και συν., 1961). Η ιστορία της επιδημίας των γαλοπουλών στη Μεγάλη Βρετανία περιγράφηκε από τον Blount (1960, 1961) ενώ από τον Allcroft (1965), συνοψίστηκε για πρώτη φορά η τοξικότητα που εμφανίζεται σε αρκετά είδη ζώων εκτροφής.

Ο προσδιορισμός των αφλατοξινών πρώτα αξιοποίησε τη βιοδοκιμή με την πάπια, ένα ιδιαίτερα ευπαθές είδος, στο οποίο ο πολλαπλασιασμός των επιθηλιακών κυττάρων του χοληφόρου πόρου ήταν σαφώς ορατός μέσα σε λίγες ημέρες από την κατάποση του τοξικού γεύματος. Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των τεσσάρων στενά συγγενικών τοξινών, αφλατοξίνες B₁, B₂, G₁ και G₂, αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Hartley και συν. (1963), ενώ οι δομές τους καθορίστηκαν το 1965 από τους Buche και συν. (Asao και συν., 1965).

Ο Butler (1965), στο πλαίσιο των πρακτικών ενός συμποσίου που πραγματοποιήθηκε στο MIT, δήλωσε προφητικά ότι "οι καρκινογόνες ιδιότητες της αφλατοξίνης είναι τώρα καλά τεκμηριωμένες, ώστε πιθανότατα να είναι απαραίτητες επιδημιολογικές μελέτες μεγάλης κλίμακας που θα αποδείξουν το ρόλο που αυτές οι φυσικές τοξίνες παίζουν στην αιτιολογία του καρκίνου του ήπατος", και τέλος, "η παρουσία ιχνών των ενώσεων όπως είναι οι μυκοτοξίνες σε τρόφιμα απαιτεί μεγάλη προσοχή αφού αποτελεί κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου". Ωστόσο, ο Oettle (1965) ήταν ο πρώτος ερευνητής που επέστησε την προσοχή στο γεγονός ότι η κατανάλωση αφλατοξίνης ενδέχεται να προκαλεί καρκίνο του ήπατος στον άνθρωπο.

5.2 Αφλατοξίνες στα ζώα

Κανένα ζωικό είδος δεν είναι ανθεκτικό στις οξείες τοξικές επιδράσεις των αφλατοξινών. Μια μεγάλη ποικιλία σε τιμές LD₅₀ (μέση θανατηφόρος δόση - θανατώνει το 50% των πειραματόζωων) έχει γίνει γνωστή σε ζωικά είδη που έχουν δοκιμαστεί με εφ' άπαξ δόσεις αφλατοξινών. Για τα περισσότερα είδη, η τιμή LD₅₀ κυμαίνεται από 0,5

έως 10 mg/kg σωματικού βάρους. Τα διάφορα είδη ζώων αντιδρούν διαφορετικά, όσον αφορά στην ευαισθησία τους στη χρόνια και οξεία τοξικότητα των αφλατοξινών. Την τοξικότητα των αφλατοξινών μπορούν να επηρεάσουν περιβαλλοντικοί παράγοντες, το επίπεδο έκθεσης και η διάρκεια της έκθεσης παράλληλα με την ηλικία, η κατάσταση υγείας και η θρεπτική σύσταση της διαίτας (Bommakanti και Waliyar, 2007).

Στα ζώα, το όργανο-στόχος για τις αφλατοξίνες είναι το ήπαρ, και έχει αποδειχθεί ότι είναι καρκινογόνες και τερατογόνες, καθώς και η αιτία της απομείωσης του σχηματισμού των πρωτεϊνών πήξης, της αφομοίωσης βάρους και της ανοσογένεσης.

5.2.1 Χοίρος

Στο χοίρο με οξεία αφλατοξίκωση οι ηπατικές αλλαγές που παρατηρούνται περιλαμβάνουν κεντρολοβική υπεραιμία και αιμορραγία, με τον πυρήνα των ηπατοκυττάρων να εμφανίζει περιθωριοποίηση της χρωματίνης και μερική πύκνωση (Cysewski και συν., 1968). Οι αλλαγές αυτές ακολουθούνται από κεντρολοβική νέκρωση, και είναι συνακόλουθες με αυξήσεις στα ένζυμα του ορού (OCT και AST) και στο χρόνο προθρομβίνης, και μειωμένη ηπατική λειτουργία.

Οι χοίροι που μολύνονται παρουσιάζουν λήθαργο, μειωμένη όρεξη και σταδιακά υποθερμία, ίκτερο και αίμα στα κόπρανά τους.

Πρόσθετες έρευνες έχουν δείξει ότι η κύρια αλλαγή στην αφλατοξίκωση των χοίρων είναι η καταστροφή του ηπατικού παρεγχύματος (Panangala και συν., 1986· Miller και συν., 1981, 1982· Cook και συν., 1989). Οι Panangala και συν. (1986) βρήκαν ότι απογαλακτισθέντα χοιρίδια στα οποία χορηγούνταν 500 ppb αφλατοξίνης στην τροφή παρουσίασαν μειωμένο ρυθμό αύξησης και αποδοτικότητα αφομοίωσης της τροφής.

Οι μελέτες αυτές συμφωνούν με παλαιότερες που έγιναν από τους Southern και Clawson (1979), και Sisk και Carlton (1972), και όρισαν τα 200 ppb αφλατοξίνης ως όριο για τη διατροφή των χοίρων.

Δεν είναι γνωστό, αν οι αφλατοξίνες επιδρούν σημαντικά στην αναπαραγωγή του χοίρου (Armbrecht και συν., 1972). Ωστόσο, η παρουσία αφλατοξινών στο γάλα των χοιρομητέρων μπορεί να έχει επιδράσεις στα χοιρίδια, καθώς και η έκθεση τους στη διάρκεια που βρίσκονται στη μήτρα μπορεί να επιδράσει στην ακεραιότητα του αμυντικού συστήματος των νεογέννητων χοιριδίων.

5.2.2 Βοοειδή

Η οξεία αφλατοξίκωση των βοοειδών προκαλεί ηπατικές διαταραχές παρόμοιες με αυτές που περιγράφηκαν για το χοίρο, μόνο που τα βοοειδή είναι λιγότερο ευάλωτα στις αφλατοξίνες (Bodine και Mertens, 1983).

Τα μολυσμένα ζώα μπορεί να εμφανίζουν μειωμένη κατανάλωση τροφής, απώλεια βάρους και μειωμένη παραγωγή γάλακτος. Οι Masri και συν. (1969) βρήκαν ότι διατροφή με αφλατοξίνες επιφέρει 33% μείωση του γάλακτος στις αγελάδες παραγωγής γάλακτος.

Οι πιο σημαντικές επιδράσεις στα βοοειδή μπορεί να συμβούν ακόμη και όταν τα ζώα καταναλώνουν μικρά επίπεδα αφλατοξινών, ενώ εμφανίζονται και χρόνιες επιδράσεις όπως μείωση στην αναπαραγωγική ικανότητα, ανοσοκαταστολή, και μείωση στην αποδοτικότητα της αφομοίωσης της τροφής.

Ο Guthrie (1979) υποστηρίζει ότι οι επιδράσεις αυτές είναι οικονομικά σημαντικές για τον παραγωγό, αφού η ημερήσια χορήγηση 120 ppb αφλατοξίνης σε αγελάδες είχε ως αποτέλεσμα την κατά 2% μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας μέσα σε μια περίοδο 5 μηνών, ενώ μετά τη διακοπή της χορήγησης παρατηρήθηκε αύξηση κατά 28% της παραγωγής γάλακτος. Στα προβλήματα υγείας που παρατηρήθηκαν, περιλαμβάνονται η γέννηση μικρών μοσχαριών, διάρροια, μαστίτιδα, μειωμένη κατανάλωση τροφής και αναπνευστικά νοσήματα.

Στα βοοειδή γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης, η χορηγούμενη στη διατροφή τους αφλατοξίνη B₁ μετατρέπεται σε M₁, η οποία είναι η αφλατοξίνη που εμφανίζεται στο γάλα. Η παρουσία 30 ppb αφλατοξίνης B₁ στη διατροφή έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία στο γάλα υπολειμμάτων M₁ σε επίπεδα μικρότερα από 1 ppb (Park και Pohland, 1986). Ο Mertens (1979) βρήκε ότι περίπου το 0,9% της προσλαμβανόμενης αφλατοξίνης μετατρέπεται στο γάλα σε αφλατοξίνη M₁. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζονται από τους Van Dijk και συν. (1984). Το προϊόν αυτό του μεταβολισμού είναι ελαφρώς λιγότερο τοξικό από την αφλατοξίνη B₁ (CAST, 1989).

Ο Richard και οι συνεργάτες του (1983) εξέτασαν την παρουσία αφλατοξίνης στο περιεχόμενο του προστόμαχου των βοοειδών ύστερα από χορήγηση σιτηρεσίου που περιείχε 460 ppb αφλατοξίνης για 15 εβδομάδες. Μετά από προθεσμία υπαναχώρησης 2,5 εβδομάδων, αφλατοξίνη ανιχνευόταν ακόμα στον προστόμαχο. Οι ερευνητές υπέθεσαν ότι η λειτουργία του προστόμαχου είχε ελαττωθεί. Όταν αυτή η υπόθεση στη συνέχεια δοκιμάστηκε χρησιμοποιώντας τεχνικές ραδιοτηλεμετρίας, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η κινητικότητα του προστόμαχου μειώθηκε σε βοοειδή στα οποία είχαν

δοθεί εφ' άπαξ δόσεις αφλατοξίνης (Cook και συν., 1986). Προγενέστερη έρευνα είχε αποδείξει ότι οι αφλατοξίνες επηρεάζουν *in vitro* και *in vivo* τις λειτουργίες του προστόμαχου, όπως η πέψη της κυτταρίνης και λιπαρών οξέων και πρωτεόλυση (Dvorak και συν., 1977).

Συμπερασματικά, στα βοοειδή η επίδραση των αφλατοξινών περιορίζεται στο ήπαρ, με συγκεκριμένες επιδράσεις οι οποίες κυμαίνονται από οξείες μέχρι χρόνιες παθήσεις, και εξαρτώνται από τη δοσολογία. Η παραγωγή γάλακτος στις αγελάδες φαίνεται να επηρεάζεται ακόμα και από την παρουσία χαμηλών επιπέδων αφλατοξινών στην τροφή, τα οποία όμως δεν έχουν άλλες επιπτώσεις στην υγεία των ζώων (Patterson και Anderson, 1982). Η αφλατοξίνη M₁ μπορεί να βρεθεί άμεσα στο γάλα των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων που διατρέφονται με αφλατοξίνες και μπορεί να προκαλέσει παθήσεις στα μοσχάρια που καταναλώνουν μολυσμένο γάλα, με την προϋπόθεση ότι υπάρχει επαρκές επίπεδο μόλυνσης (Van Dijk και συν., 1984). Ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων έχει θεσπίσει τα 100 ppb αφλατοξίνης ως όριο στο καλαμπόκι, όταν χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή για βοοειδή αναπαραγωγής, και τα 20 ppb για το καλαμπόκι με το οποίο διατρέφονται τα βοοειδή γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης (CAST 1989).

5.2.3 Πτηνά

Η βιομηχανία πτηνών πλήττεται πιθανόν περισσότερο από κάθε άλλο είδος ζωικής παραγωγής, εξαιτίας του γεγονότος ότι τα πτηνά φαίνεται να είναι πιο ευάλωτα στις επιδράσεις της διατροφής με αφλατοξίνες, και οι απώλειες μπορεί να είναι αρκετά σοβαρές (Hamilton, 1971).

Η ευπάθεια στις αφλατοξίνες ποικίλει στα κοτόπουλα, ανάλογα με τη δοσολογία, τη θρεπτική κατάσταση, την περιβαλλοντική καταπόνηση, την ποικιλία και το φύλο. Η παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων αφλατοξινών στο σιτηρέσιο μπορεί να οδηγήσει σε ελλιποβαρή κοτόπουλα με μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης, μειωμένη παραγωγή αυγών και αποδοτικότητα αφομοίωσης τροφής. Η μειωμένη παραγωγή αυγών παρατηρήθηκε σε αρκετές έρευνες μέχρι σήμερα (Garlich και συν., 1973· Wolzak και συν., 1985· Dhanasekaran και συν., 2011).

Και πάλι, η κύρια βλάβη είναι στο ήπαρ, το οποίο εμφανίζεται ωχρο με στίγματα, και παρουσιάζει πετεχειώδεις αιμορραγίες. Μπορεί να υπάρχει οίδημα και κενотоποίηση των ηπατοκυττάρων, και πολλαπλασιασμός του χοληδόχου πόρου. Η αφλατοξίνη πιθανόν να είναι η αιτία για την εμφάνιση του συνδρόμου του λιπώδους ήπατος στις

όρνιθες ωοπαραγωγής, μία νόσο που μπορεί να προκαλέσει σημαντικές απώλειες σε μεγάλα ωοτόκα κοπάδια (Hamilton και Garlich, 1971). Μαζί με τις παθολογικές αλλαγές στο ήπαρ, εμφανίζονται και αυξήσεις των ειδικών ηπατικών ενζύμων του ορού. Αν και οι γαλοπούλες φαίνεται να είναι πιο επιρρεπείς στις αφλατοξίνες σε σύγκριση με τα κοτόπουλα, οι επιδράσεις των αφλατοξινών σε αυτό το είδος είναι παρόμοιες με εκείνες που βρέθηκαν στα κοτόπουλα (Richard και συν., 1986). Η κατανάλωση τροφής μολυσμένης με αφλατοξίνη, σε συγκέντρωση 1 ppm, οδηγεί σε θανάτους λόγω οξείας ηπατικής νέκρωσης και αιμορραγίας (Pier, 1981).

Από όλα τα είδη πτηνών που έχουν εξεταστεί, οι μικρές πάπιες φαίνεται να είναι οι πιο ευαίσθητες στις αφλατοξίνες και, για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται στις βιοδοκιμές για αφλατοξίνες. Η οξεία αφλατοξίκωση στα παπάκια είναι παρόμοια με εκείνη στις γαλοπούλες και τα κοτόπουλα.

Οι Kratzer και συν. (1968) υποστηρίζουν ότι επίπεδα αφλατοξίνης 1.600 ppb στο σιτηρέσιο κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής για 8 εβδομάδες δεν παράγει ανιχνεύσιμα υπολείμματα στο βρώσιμο κρέας τους. Ομοίως, η αφλατοξίνη δεν ανιχνεύεται στο κρέας ή στα αυγά ωοτόκων ορνίθων οι οποίες διατρέφονταν για 48 ημέρες με σιτηρέσιο στο οποίο τα επίπεδα αφλατοξίνης ανέρχονταν στα 2.700 ppb.

5.2.4 Κουνέλια

Τα κουνέλια είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στις αφλατοξίνες, με την LD₅₀ να είναι 0,3 mg αφλατοξίνης ανά kg σωματικού βάρους. Σε κουνέλια που τρέφονταν για 30 ημέρες με ζωοτροφές που περιείχαν 15 mg αφλατοξίνης / kg παρατηρήθηκαν συμπτώματα αιμολυτικής αναιμίας. Επίσης, παρατηρήθηκαν ισχυρές κυτταροτοξικές επιδράσεις (Verma και Mehta, 1998).

5.2.5 Κυνοειδή

Η αφλατοξίκωση στα κυνοειδή αναφέρθηκε αρχικά το 1952 από τους Seibold και Bailey, οι οποίοι περιέγραψαν μια ασθένεια του ήπατος που ονομάστηκε ηπατίτιδα "X", και παρατηρήθηκε σε σκύλους που τρέφονταν με μολυσμένες, μouxλιασμένες ζωοτροφές.

Τα σκυλιά και οι γάτες είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στις αφλατοξίνες. Η θανατηφόρος δόση, LD₅₀, της AFB₁ στους σκύλους είναι 0,5 - 1,5 mg/kg, ενώ στις γάτες είναι 0,3 - 0,6 mg/kg (Rumbeiha, 2001).

Ζωοτροφές που περιέχουν συγκεντρώσεις AFB₁ των 60 ppb, ή υψηλότερες, προκάλεσαν αφλατοξίκωση στα ζώα συντροφιάς. Όπως με άλλες τοξικές ενώσεις, η ευαισθησία εξαρτάται από την ατομική ευαισθησία, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται - μεταξύ άλλων παραγόντων - από την ηλικία, την ορμονική κατάσταση (πχ. εγκυμοσύνη) και τη διατροφική κατάσταση (Rumbeiha, 2001).

Τα σκυλιά που εκτίθενται σε αφλατοξίνη παρουσιάζουν ανορεξία, κατάθλιψη, ίκτερο, κατάπτωση, μέλαινα (αίμα στα κόπρανα), αιμορραγίες, και πνευμονικό οίδημα (FDA, 1979· Liggett και συν., 1986· Bastianello και συν., 1987· Thornburg και Raisbeck, 1988). Επιπλέον, η οξεία αφλατοξίκωση προκαλεί στους σκύλους και στις γάτες έμετο, πολυουρία, πολυδιψία, και αύξηση των ηπατικών ενζύμων στον ορό του αίματος (Rumbeiha, 2001).

Σε κυνοειδή με αφλατοξίκωση, το ήπαρ είναι οίδηματικό, και παρατηρούνται πετεχιώδεις αιμορραγίες στα ούλα, καθώς και στο γαστρεντερικό σωλήνα, στους πνεύμονες, και σε υπεζωκότα, επικάρδιο και ουροδόχο κύστη. Οι αιμορραγίες σχετίζονται με κίτρινο, κόκκινο-κίτρινο, πορτοκαλί ή αποχρωματισμό του ήπατος, και ίκτερο του επιπεφυκότα (Chaffee και συν., 1969· FDA, 1979· Rumbeiha, 2001). Επίσης, έχουν αναφερθεί λεμφική εξάντληση και νέκρωση του θύμου αδένα, σπλήνα και λεμφαδένων, αιμορραγία του πλακούντα, και κυκλοφορική συμφόρηση και αιμορραγία στο φλοιό των επινεφριδίων (Newberne και συν., 1966).

Σε υποξεία αφλατοξίκωση, τα σκυλιά και οι γάτες που πλήττονται παρουσιάζουν λήθαργο, ανορεξία, πολυουρία, πολυδιψία, αυξημένα ηπατικά ένζυμα και ίκτερο. Στις χρόνιες αφλατοξικώσεις, τα σκυλιά και οι γάτες θα έχουν κλινικά συμπτώματα παρόμοια με την υποξεία αφλατοξίκωση, με εμφανή ίκτερο. Επίσης, η χρόνια αφλατοξίκωση μπορεί να προκαλέσει ανοσοκαταστολή, ακολουθούμενη από μη ειδικά κλινικά συμπτώματα, όπως αυξημένη ευπάθεια σε ιογενείς, βακτηριακές, μυκητιακές ή παρασιτικές λοιμώξεις (Rumbeiha, 2001).

5.2.6 Ψάρια

Τα ψάρια έχουν βρεθεί ευπαθή σε αφλατοξίνες και τριχοθεσίνες. Η αφλατοξίκωση είναι πιο διαδεδομένη μεταξύ των ψαριών. Η έκταση των βλαβών που προκαλούνται από την κατανάλωση αφλατοξινών εξαρτάται από την ηλικία και το είδος των ψαριών. Τα μικρά ψάρια είναι πιο επιρρεπή, σε σχέση με τα ενήλικα, στην αφλατοξίκωση, και ορισμένα είδη ψαριών είναι πιο ευαίσθητα σε αφλατοξίνες από άλλα (Royes και Yanong, 2002).

Η ιριδίζουσα πέστροφα είναι το πιο ευαίσθητο είδος στην αφλατοξίνη. Στις πέστροφες η χορήγηση σιτηρεσίου που περιέχει λιγότερο από 1 ppb αφλατοξίνης έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί όγκους του ήπατος σε 20 μήνες (Horn και συν., 1989). Σιτηρέσιο που περιέχει AFB₁ σε συγκέντρωση 0,4 ppb για 15 μήνες είχε 14% πιθανότητες να αναπτύξει όγκους. Η χορήγηση σιτηρεσίου που περιέχει 20 ppb για 8 μήνες οδήγησε σε εμφάνιση 58% όγκων του ήπατος, και η συνέχιση της χορήγησής του για 12 μήνες οδήγησε σε συχνότητα 83% των όγκων (Royes και Yanong, 2002).

Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το 50% του αποθέματος ψαριών πεθαίνει γρήγορα, εάν τα επίπεδα της αφλατοξίνης που περιέχονται στη διατροφή τους κυμαίνονται από 500 έως 1000 ppb. Τα θερμόφιλα είδη ψαριών όπως το γατόψαρο των καναλιών (*Ictalurs punctatus*) είναι πολύ λιγότερο ευαίσθητα από ό, τι η ιριδίζουσα πέστροφα, και το επίπεδο που απαιτείται για να προκαλέσει ποσοστό 50% θνησιμότητας είναι περίπου 30 φορές αυτό της ιριδίζουσας πέστροφας (Horn και συν., 1989). Γατόψαρα των οποίων το σιτηρέσιο περιείχε καθαρή AFB₁ σε συγκέντρωση 10.000 ppb για 10 εβδομάδες εμφάνισαν μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης και ήπιες εσωτερικές βλάβες (Royes και Yanong, 2002).

Τα αρχικά ευρήματα που συνδέονται με αφλατοξίκωση σε ψάρια περιλαμβάνουν κιτρινωπά βράγχια, διαταραχή της πήξης του αίματος, χαμηλούς ρυθμούς αύξησης ή έλλειψη αφομοίωσης βάρους. Η παρατεταμένη χορήγηση στο σιτηρέσιο χαμηλών συγκεντρώσεων AFB₁ προκαλεί τη δημιουργία όγκων στο ήπαρ, οι οποίοι εμφανίζονται ως υποκίτρινες βλάβες και οι οποίοι μπορεί να εξαπλωθούν στο νεφρό. Ακόμη, μπορεί να παρατηρηθεί και αύξηση της θνησιμότητας (Royes and Yanong, 2002).

Επίσης, οι αφλατοξίνες μπορεί να καταστείλουν το ανοσοποιητικό σύστημα, καθιστώντας τα ψάρια πιο ευαίσθητα στις βακτηριακές, ιογενείς και παρασιτικές ασθένειες. Επιπλέον, η αφλατοξίνη μπορεί να προκαλέσει αργό ρυθμό ανάπτυξης και μείωση του βάρους του τελικού προϊόντος των θερμόφιλων ειδών (Royes και Yanong, 2002).

5.2.7 Άγρια ζωή

Πτηνά, ψάρια και θηλαστικά διαφέρουν μεταξύ των ειδών, όσον αφορά στην ευαισθησία τους σε αφλατοξίνες. Ορισμένα πτηνά, όπως ορτύκια και άγριες γαλοπούλες, φαίνεται να είναι πιο επιρρεπή από τα θηλαστικά (Horn και συν., 1989).

Είναι δύσκολο να τεκμηριωθεί η έκταση στην οποία τα είδη της άγριας πανίδας επηρεάζονται, επειδή τα άγρια ζώα είναι ελεύθερης μετακίνησης. Επίσης, σε πολλές

περιπτώσεις, τα αρπακτικά ζώα και οι κοπρονεκροφάγοι καταναλώνουν νεκρά ή ετοιμοθάνατα ζώα, πριν τα νεκρά αυτά ζώα βρεθούν από τον άνθρωπο (Stewart και Larson, 2002).

Τα κλινικά συμπτώματα της αφλατοξίκωσης στην άγρια πανίδα ποικίλλουν, ανάλογα με τη δόση που δέχεται, τη χρονική διάρκεια της έκθεσης, και τα είδη των ζώων. Οι τοξικές επιδράσεις μπορούν να χωριστούν σε οξείες, υποξείες και χρόνιες εκθέσεις (Stewart και Larson, 2002).

Οι οξείες επιδράσεις αντικατοπτρίζονται από σοβαρή ηπατική νόσο. Τα ζώα μπορεί να παρουσιάζουν αναιμία και δυσκολία στην αναπνοή. Ακόμη, μπορεί να εμφανιστεί αιφνίδιος θάνατος χωρίς κλινικά συμπτώματα.

Οι υποξείες επιδράσεις επιτρέπουν στα ζώα να ζήσουν για ένα μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Τα ζώα αυτά έχουν κίτρινα μάτια, βλεννογόνους, ή ωχροό δέρμα, μαζί με ανωμαλίες στην πήξη του αίματος. Μπορεί κανείς να παρατηρήσει μώλωπες, αιμορραγίες από τη μύτη, καθώς και αιμορραγικές αλλοιώσεις σε διάφορα όργανα.

Οι χρόνιες επιδράσεις γενικά σχετίζονται με ηπατική δυσλειτουργία. Μακροπρόθεσμα, το χαμηλό επίπεδο κατανάλωσης των αφλατοξινών μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένο δείκτη μετατρεψιμότητας τροφής, απώλεια σωματικού βάρους, έλλειψη όρεξης, καθώς και αυξημένη ευαισθησία σε δευτερογενείς μολυσματικές ασθένειες. Οι βλάβες μπορεί να εμφανιστούν στο ήπαρ και σε άλλα όργανα, ενώ στην κοιλιακή κοιλότητα μπορεί να συσσωρευτεί υγρό (ασκίτης).

Πίνακας 5.1. Συγκριτικές τιμές LD₅₀: οι θανατηφόρες δόσεις της αφλατοξίνης B₁ (Dhanasekaran και συν., 2011).

Είδος	Από του στόματος LD ₅₀ / θανατηφόρος δόση (mg/Kg)
Chick embryo (Εμβryo κότας)	0.025
Duckling (Παπάκι)	0.3
Turkey poultry (Γαλοπούλα)	0.5
Chicken, Rhode Island (Κότα φυλής Rhode Island)	6.3
Sheep (Πρόβατο)	5.0
Rat(male) [Ποντίκι (αρσενικό)]	7.2
Rat(female) [Ποντίκι (θηλυκό)]	17.9
Rabbit (Κουνέλι)	0.3

Cat (Γάτα)	0.6
Pig (Χοίρος)	0.6
Guinea pig (Χοίρος Γουινέας)	1.4
Hamster (Χάμστερ)	10.2
Mouse (Επίμυς)	9.0
Baboon (Μπαμπούνος)	2.0

5.2.8 Καρκινογένεση σε ζώα

Μετά από έναν ευρύ αριθμό πειραμάτων σε πολλά είδη ζώων, όπως οι αρουραίοι και η ιριδίζουσα πέστροφα, η αφλατοξίνη - ιδιαίτερα η αφλατοξίνη B₁ - επιβεβαιώνεται ως μία δυνητικά καρκινογόνος ουσία (IARC, 1993).

Η τοξικότητα και η ικανότητα καρκινογένεσης της αφλατοξίνης B₁ επηρεάζονται από μια ποικιλία παραγόντων, όπως είναι η διατροφή, η μικροσωματική δραστηριότητα, η ηλικία, το φύλο, και το είδος του ζώου. Ο αποδέκτης της τοξικής προσβολής μεταβολίζει ή ενεργοποιεί τις αφλατοξίνες κυρίως με το ηπατικό μικροσωματικό σύστημα της οξειδάσης (Shimada και Guengerich, 1989). Ο μεταβολισμός παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του βαθμού τοξικότητας (Eaton και συν., 1994).

Μετά την κατάποση, η αφλατοξίνη μεταβολίζεται από το κυτόχρωμα P450. Η μητρική ουσία κανονικά αποτοξινώνεται από τη μετατροπή της σε υδροξυλιωμένα ενδιάμεσα παράγωγα (π.χ., αφλατοξίνες Q₁, P₁, M₁, και B_{2a}), ανάλογα με τη γενετική προδιάθεση των ειδών, που είναι υδατοδιαλυτά και αποβάλλονται μέσω των ούρων ή της χολής. Ωστόσο, μαζί με τα παραπάνω μπορεί να σχηματιστούν ορισμένα ενδιάμεσα παράγωγα της αφλατοξίνης B₁, όπως το 8,9 εποξείδιο, που αντιδρούν με μακρομόρια (DNA, RNA, και πρωτεΐνες) και σχηματίζουν σύμπλοκα (Busby και Wogan, 1981). Το ποσό αυτού του μεταβολίτη αποφασίζει την ευαισθησία των ειδών, καθώς αυτό μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις στο DNA, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο μόριο με τη γουανίνη (Smela και συν., 2001). Αυτή η παρεμβολή του εποξειδίου προκαλεί αντικατάσταση της βάσης γουανίνης με θυμίνη, στο κωδικόνιο 249 του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 στο ήπαρ, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο ήπατος. Αυτό παρατηρήθηκε στα περισσότερα από τα πειραματικά μοντέλα, και τεκμαίρεται ότι αυτός είναι ο κυριότερος λόγος για την καρκινογένεση της αφλατοξίνης (Katherine και συν., 1997· Railey και συν., 1997).

Το μεγαλύτερο DNA σύμπλοκο που σχηματίζεται τόσο in vivo όσο και in vitro σε αυτή την αντίδραση είναι η 8, 9-διυδρο-8 (N7-γουανυλ)-9-υδροξυ αφλατοξίνη B₁. Το σύμπλοκο αυτό είναι ύποπτο για την τοξικότητα, ιδίως τη μεταλλαξιογένεση και καρκινογένεση των αφλατοξινών στα ζώα (Busby και Wogan, 1981).

Η καρκινογένεση των αφλατοξινών έχει αποδειχθεί σε μια ποικιλία ζωικών ειδών.

Πάπιες στις οποίες χορηγούνταν σιτηρέσιο που περιείχε 0,035 ppm αφλατοξίνης ανέπτυξαν ηπατικούς όγκους μέσα σε χρονικό διάστημα 14 μηνών (Carnaghan, 1965).

Σε άλλη περίπτωση, αποδείχτηκε η δημιουργία ηπατώματος στο 96% των ψαριών, σε πέστροφες στις οποίες για 20 μήνες χορηγούνταν σιτηρέσιο που περιείχε 20 ppb αφλατοξίνης (Halver, 1969). Όλα τα αρσενικά ποντίκια που σιτίστηκαν με 15 ppb αφλατοξίνης B₁ για 68 εβδομάδες ανέπτυξαν ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, ενώ το ίδιο συνέβη και στους θηλυκούς αρουραίους που ακολούθησαν την ίδια διατροφή για 80 εβδομάδες (Wogan και Newberne, 1967).

Μελέτες που ακολούθησαν αυτές τις πρώτες έρευνες, απέδειξαν νεοπλάσματα που προκλήθηκαν από αφλατοξίνες και σε άλλα είδη, όπως τα κουνάβια, τα ψάρια ενυδρείου, ποντίκια, μαϊμούδες, και πρόβατα (CAST, 1989).

Οι Shalkor και Armbrecht (1974) ανέφεραν ότι παρατήρησαν αδενώματα ηπατικών κυττάρων σε χοιρομητέρες, στις οποίες για 20 μήνες χορηγούνταν σιτηρέσιο που περιείχε αφλατοξίνη.

Παρ' όλα αυτά, η σημασία της καρκινογένεσης στα ζώα μειώνεται, εξαιτίας του σχετικά σύντομου χρονικού διαστήματος κατά το οποίο τα ζώα αυτά είναι πιθανόν να τρέφονται με σιτηρέσιο μολυσμένο με αφλατοξίνη πριν από τη στιγμή που θα διατεθούν στην αγορά για σφαγή.

5.2.9 Ανοσοκαταστολή

Ένα από τα σημαντικότερα οικονομικά ζητήματα του προβλήματος των αφλατοξινών είναι η ελάττωση της ανοσίας και της φυσικής άμυνας στα ζώα. Εντός της πρώτης δεκαετίας έρευνας που ακολούθησε ύστερα από την αναγνώριση των αφλατοξινών, είχε δημοσιευθεί μια εργασία σχετικά με την επίδραση αυτών των τοξικών μεταβολιτών σε διάφορα ανοσοποιητικά φαινόμενα (Richard και συν., 1978). Μία από τις αρχικές μελέτες έδειξε ότι η ανάπτυξη των αντισωμάτων σε εμβολιασμένα ποντίκια είχε επηρεαστεί (Galikeen και συν., 1968).

Κατά τη διάρκεια ή μετά τον εμβολιασμό για την *Pasteurella multocida* σε γαλοπούλες που τρέφονταν με σιτηρέσια που περιείχαν αφλατοξίνη B₁, παρατηρήθηκε ότι δεν

επηρεάστηκαν ούτε οι συγκολλητίνες, ούτε οι ιζηματίνες (Pier και Heddleston, 1970). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν για την αιμοσυγκολλητίνη της *Salmonella pullorum*, σε νεοσσούς, στους οποίους χορηγήθηκε σιτηρέσιο με αφλατοξίνη (Adinarayanaiah και συν., 1973).

Ορισμένοι μη ειδικοί χυμικοί παράγοντες που σχετίζονται με μια ποικιλία διεργασιών του ανοσοποιητικού έχουν επηρεαστεί από τις αφλατοξίνες, και μπορεί να σχετίζονται με την ικανότητα των αφλατοξινών να παρεμβαίνουν στην πρωτεϊνική σύνθεση.

Η ενζυμική δραστηριότητα του συμπληρώματος ελαττώθηκε σε ινδικά χοιρίδια στα οποία δόθηκαν αφλατοξίνες (Thurston και συν., 1972).

Η ενεργότητα του συστατικού αυτού του ορού ελαττώθηκε λόγω αφλατοξινών και σε πτηνά, χοίρους και βοοειδή (Richard, 1991).

Οι επιδράσεις των αφλατοξινών στην ανθεκτικότητα των ζώων σε μολυσματικούς παθογόνους παράγοντες είναι κατά κάποιο τρόπο εξαρτώμενες από μεταβλητές όπως είναι ο οργανισμός, η δόση και το είδος αφλατοξίνης, το είδος ζώου, και ίσως η ευαισθησία της εξέτασης.

Στον Πίνακα 5.2 παρατίθενται οι διάφορες παράμετροι που έχουν δοκιμαστεί σε αυτό το θέμα.

Πίνακας 5.2. Αλλαγές στην απόκριση σε διάφορους μολυσματικούς παράγοντες, προκαλούμενες από την έκθεση σε αφλατοξίνες διαφόρων ζωικών ειδών (Robens και Richard, 1992)

Μικροοργανισμός	Είδος Ζώου	Απόκριση	Βιβλιογραφική Αναφορά
<i>Candida albicans</i>	Όρνιθα	Αυξημένη ευαισθησία	Hamilton και Harris (1971)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Γαλοπούλα	Καμία αλλαγή	Richard και συν. (1973)
<i>Eimeria tenella</i>	Όρνιθα	Αυξημένη ευαισθησία	Edds και συν. (1973) Wyatt και συν. (1975)
<i>Salmonella gallinarum</i>	Όρνιθα	Καμία αλλαγή	Smith και συν. (1969)
<i>Salmonella</i> spp	Όρνιθα	Αυξημένη ευαισθησία	Boonchuvit και συν. (1975)
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	Χάμστερ	Καμία αλλαγή	Larsen και συν. (1975)
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Κύκνος	Ανοσοκαταστολή	Cysewski και συν. (1978)
<i>Treponema hyodysenteriae</i>	Κύκνος	Αυξημένη ευαισθησία	Joens και συν. (1981)
<i>Streptococcus</i> sp και <i>Staphylococcus</i>	Βοοειδή	Αυξημένη φλεγμονή	Brown και συν. (1981)
Ιός της ασθένειας Newcastle	Όρνιθα	Αυξημένη ευαισθησία	Byong και Rothenbacker (1982)
Ιός βρογχίτιδας	Όρνιθα	Αυξημένη ευαισθησία	Ratanesthankui (1983)

Φαίνεται ξεκάθαρα λοιπόν ότι η έκθεση σε αφλατοξίνες επηρεάζει την κυτταρική απόκριση του οργανισμού. Οι επιδράσεις αυτές προφανώς σχετίζονται με τις λειτουργικές πτυχές των εμπλεκόμενων κυττάρων, όπως η παραγωγή λεμφοκυτταροκινών και η φαγοκυττάρωση των αντιγόνων από τα μακροφάγα (Pier και McLoughlin, 1985).

Έχει αποδειχθεί ότι η αφλατοξίνη προκαλεί μείωση στην ικανότητα των μακροφάγων να φαγοκυττάρωνουν αντιγόνα (Richard και Thurston 1975).

Η σημασία μιας σειράς επιπτώσεων ορισμένων μυκοτοξινών στα ζωικά συστήματα είναι άγνωστη, αλλά διαφορές ως προς τις επιπτώσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα μεταξύ της B₁ αφλατοξίνης και των μεταβολιτών της δεν υπάρχουν (Bodine και Mertens, 1983).

In vitro, η αφλατοξίνη Q₁ είναι ικανή να προκαλέσει καταστολή της λεμφοβλαστογένεσης, χρησιμοποιώντας λεμφοκύτταρα βοοειδών. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί από άλλους ερευνητές, οι οποίοι χρησιμοποίησαν λεμφοκύτταρα χοίρων (Yang, 1983).

Η ανοσοκαταστολή έχει αποδειχθεί σε ζώα ακόμη και μετά από εμβρυϊκή έκθεση. Όταν αφλατοξίνη μεταφέρθηκε στον πλακούντα χοίρων, τα εμβολιασμένα με νεκρά *Mycobacterium paratuberculosis* στη μήτρα χοιρίδια εμφάνισαν μειωμένη ανοσοαπόκριση και δερματική υπερευαισθησία, όταν υποβλήθηκαν ξανά στο *Mycobacterium*, 2 εβδομάδες αργότερα (Pier και συν., 1985).

Συμπερασματικά, στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι αφλατοξίνες επιδρούν στην ανοσία χωρίς να καταστέλλουν τη σύνθεση των αντισωμάτων, αλλά με την καταστολή ειδικών χυμικών παραγόντων που εμπλέκονται στην ανοσογένεση, την αναστολή της φαγοκυττάρωσης από τα μακροφάγα, την απλασία του θύμου αδένου και την καταστολή της κυτταρικής ανοσίας (Pier και McLoughlin, 1985· CAST, 1989).

5.2.10 Αναπαραγωγή και εκκολαπτικότητα σε όρνιθες

Οι αφλατοξίνες προκαλούν καθυστέρηση ωρίμανσης τόσο των αρσενικών, όσο και των θηλυκών (Doerr, 1979; Doerr και Ottinger, 1980). Αφλατοξίκωση σε λευκά αρσενικά κοτόπουλα φυλής Λέγκχορν οδήγησε σε μείωση της κατανάλωσης ζωοτροφής, του σωματικού τους βάρους, του βάρους των όρχεων και του όγκου του σπέρματος (Sharlin και συν., 1980), και μείωση της συγκέντρωσης της τεστοστερόνης στο πλάσμα (Sharlin και συν., 1980).

Παράλληλα, σε αρσενικά κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής παρατηρήθηκαν μείωση του σωματικού βάρους και ήπια αναιμία, χωρίς αλλοιώσεις στα χαρακτηριστικά του σπέρματος (Wyatt, 1991· Briggs και συν., 1974).

Σε ώριμες ωοπαραγωγικές όρνιθες που προσβλήθηκαν από αφλατοξίκωση, παρατηρήθηκαν ηπατομεγαλία και λιπώδες ήπαρ, και αξιοσημείωτη μείωση στην παραγωγή αυγών (Hamilton και Garlich, 1972). Σε ενήλικες όρνιθες κρεατοπαραγωγής παρατηρήθηκε σοβαρή μείωση της εκκολαπτικότητας μετά από κατανάλωση αφλατοξίνης (Howarth και Wyatt, 1976). Η εκκολαπτικότητα μειώνεται πολύ περισσότερο σε σύγκριση με την παραγωγή αυγών και είναι η πιο ευαίσθητη παράμετρος της αφλατοξίκωσης στην κτηνοτροφία των ορνίθων κρεατοπαραγωγής (Howarth και Wyatt, 1976).

Η άμεση και σοβαρή μείωση της εκκολαπτικότητας βρέθηκε να προκύπτει από την αύξηση της πρώιμης εμβρυϊκής θνησιμότητας, και όχι από τη στειρότητα των ορνίθων.

Η αιτία της αυξημένης εμβρυϊκής θνησιμότητας είναι η μεταφορά των τοξικών μεταβολιτών από τη διατροφή της όρνιθας στο αυγό (Wyatt, 1991). Η καθυστερημένη ανταπόκριση στην παραγωγή αυγών είναι πιθανό να συμβαίνει λόγω της μείωσης της σύνθεσης και μεταφοράς των λεκιθικών πρόδρομων ουσιών (π.χ. χολίνη) στο ήπαρ (Huff και συν., 1975).

5.3 Αφλατοξίνες και δημόσια υγεία

Οι κίνδυνοι των αφλατοξινών για την ανθρώπινη υγεία, οφείλονται κυρίως σε άτομα που τρώνε τρόφιμα μολυσμένα με αφλατοξίνη. Η λήψη προληπτικών μέτρων κατά της μόλυνσης αυτής είναι πολύ δύσκολη. Ο λόγος είναι ότι η παρουσία μυκήτων στα τρόφιμα ή υλικά τροφίμων είναι πολύ κοινή. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, αναφέρεται μια θετική συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων από αφλατοξίνη και της εμφάνισης καρκίνου.

Η αφλατοξίκωση στον άνθρωπο έχει αναφερθεί σε πολλές χώρες όπως είναι η Ινδία, η Κίνα, η Ταϊλάνδη, και πολλές αφρικανικές χώρες. Σε αφρικανικές και ασιατικές χώρες, όπου οι περιβαλλοντικές συνθήκες ευνοούν το επίπεδο επιμόλυνσης από αφλατοξίνες, η απειλή για την ανθρώπινη υγεία από τις αφλατοξίνες είναι σε αρκετά υψηλά επίπεδα. Μελέτες, σχετικά με την έκθεση σε αφλατοξίνες και την επίπτωσή τους στη δημιουργία καρκίνου του ήπατος, σε μέρη όπως η Κίνα και η Δυτική Αφρική, έδειξαν ότι η κατάσταση ήταν ανησυχητική.

Πολλά ασιατικά και αφρικανικά ερευνητικά ιδρύματα για την έρευνα της νόσου έδειξαν ότι η αφλατοξίνη σε τρόφιμα έδειξε θετική συσχέτιση με καρκινικά κύτταρα του ήπατος. Η κατανάλωση τροφίμων με χαμηλές συγκεντρώσεις αφλατοξίνης για μεγάλο χρονικό διάστημα ήταν η κύρια αιτία καρκίνου του ήπατος, καρκίνου του στομάχου, καρκίνου του παχέος εντέρου και άλλων ασθενειών. Το 1988, ο Διεθνής Οργανισμός Ερευνών για τον Καρκίνο (IARC) κατέταξε την αφλατοξίνη B₁ στην κατηγορία των καρκινογόνων ουσιών.

Η πιθανότητα καρκινογένεσης λόγω αφλατοξίνης είναι 900 φορές μεγαλύτερη από εκείνη της εμφάνισης καρκίνου του ήπατος που προκαλείται από τη διμεθυλνιτροσαμίνη. Οι αφλατοξίνες μπορούν κυρίως να προκαλέσουν καρκίνο του ήπατος, καρκίνο του νεφρού, του παχέος εντέρου, του μαστού, των ωοθηκών, του λεπτού εντέρου και άλλων οργάνων σε άλλα σημεία του σώματος.

Η έρευνα που διεξάγεται σχετικά με την έκθεση των ανθρώπων σε αφλατοξίνες στην Ινδία δεν ανταποκρίνεται στην έκταση της έκθεσης στη συγκεκριμένη περιοχή. Ωστόσο, το πρόβλημα υφίσταται και μπορεί να ξεσπάσει ανά πάσα στιγμή στο εγγύς μέλλον, καθώς οι επιδράσεις της μόλυνσης από αφλατοξίνες σε τρόφιμα και ζωοτροφές είναι πολύ κοινές.

5.3.1 Τοξικότητα

Η αφλατοξίνη B₁ (AFB₁) είναι η πιο διαδεδομένη μορφή, αλλά και η πιο ισχυρή από αυτές τις τοξίνες. Η μέση θανατηφόρος δόση της αφλατοξίνης B₁ σε σχέση με το σωματικό βάρος είναι 0,36 mg / kg.

Στα ζώα και στον άνθρωπο, η τοξίνη υφίσταται καταβολισμό μέσω ενός αριθμού ανταγωνιστικών οδών. Αυτές οι οδοί έχουν ανασκοπηθεί και συνοψίζονται στο Σχήμα 5.1.



Σχήμα 5.1 Οδοί και συνέπειες της αφλατοξίνης κατά το μεταβολισμό του ανθρώπου και των ζώων (Williams και συν., 2004)

Η αξιολόγηση των συνεπειών της έκθεσης του ανθρώπου σε αφλατοξίνη απαιτεί την εκτίμηση πολυάριθμων γεγονότων.

Πρώτον, όλη η ποσότητα αφλατοξίνης που καταναλώνεται δεν είναι βιολογικά σημαντική. Κάθε φορά ένα ποσοστό των προσλαμβανόμενων ποσοτήτων αφλατοξίνης αποτοξινώνεται, και η έκθεση μπορεί να επηρεάσει με διαφορετικό τρόπο διάφορα βιολογικά συστήματα (Σχήμα 5.1), σύμφωνα με το κλάσμα που ακολουθεί κάθε οδό. Ενώ η σχέση ανάμεσα στην DNA-σχετιζόμενη έκθεση και τον καρκίνο έχει κατανοηθεί αρκετά καλά, ώστε να υπολογίζει τις συνέπειες της αλλαγής των συγκεντρώσεων αφλατοξινών στα τρόφιμα για τον κίνδυνο για τους ανθρώπους, η επίδραση των άλλων μεταβολικών διεργασιών στον άνθρωπο δεν έχει αποδειχθεί. Η αφλατοξίνη AFM_1 είναι ένα προϊόν αποτοξίνωσης που απεκκρίνεται γρήγορα, αλλά μπορεί να έχει σημαντικές ανοσολογικές και θρεπτικές συνέπειες στα νεαρά άτομα (Williams και συν., 2004).

Δεύτερον, σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της συνέπειας της κατανάλωσης αφλατοξίνης μπορεί να έχουν άλλες πτυχές της διατροφής. Σε πολλά είδη ζώων, οι τοξικότητες της αφλατοξίνης μπορεί να τροποποιούνται από τη διαιτητική πρόσληψη αντιοξειδωτικών βιταμινών, όπως οι βιταμίνες A, C και E.

Τρίτον, το ποσό της βιολογικής έκθεσης εξαρτάται από την πιθανή ταυτόχρονη μόλυνση από HBV (hepatitis B virus, ιός ηπατίτιδας B) και HCV (hepatitis C virus, ιός ηπατίτιδας C), και ενώ το φαινόμενο αυτό έχει μελετηθεί για την επίδρασή του στον

κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου, δεν έχει αξιολογηθεί για άλλες γνωστές τοξικότητες της αφλατοξίνης (Williams και συν., 2004).

Η επικινδυνότητα των αφλατοξινών αυξάνεται ιδιαίτερα στα άτομα που πάσχουν από ηπατίτιδα Β και C. Ταυτόχρονη μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας και έκθεση σε αφλατοξίνες αυξάνει τον κίνδυνο για ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Ο ιός της ηπατίτιδας δυσχεραίνει το μεταβολισμό των αφλατοξινών από τα ηπατοκύτταρα και έτσι η ένωση προσθήκης αφλατοξίνης M₁-DNA παραμένει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο ήπαρ, αυξάνοντας την πιθανότητα βλάβης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53. Ο εμβολιασμός κατά της ηπατίτιδας στην Ασία και Αφρική, όπου ενδημεί ο ιός HBV, θα μειώσει σημαντικά τις ηπατικές βλάβες σε πληθυσμούς που συχνά τρέφονται με μολυσμένα τρόφιμα (Williams και συν., 2004).

5.3.2 Βιοδείκτες της έκθεσης

Κατά τις δύο τελευταίες δεκαετίες, η αξιολόγηση της έκθεσης σε αφλατοξίνη έχει εξελιχθεί σημαντικά, και αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο χαρακτηρισμό των βιολογικών δεικτών τόσο για την έκθεση σε αφλατοξίνες, όσο και την επίδρασή τους στην ανθρώπινη υγεία (Groopman και συν., 2005· 2008).

Οι βιοδείκτες είναι ένα μέτρο της κυτταρικής, βιοχημικής ή μοριακής αλλαγής στα βιολογικά μέσα (ανθρώπινους ιστούς, κύτταρα ή υγρά), το οποίο δίνει πληροφορίες αναφορικά με την εκτίμηση κάποιας έκθεσης, ή μιας αλλαγής που σχετίζεται με ένα μεταβολικό μονοπάτι, υποδεικνύοντας την παρουσία ή την έκταση μιας παθολογικής κατάστασης (Groopman, 2005).

Ως βιοδείκτες έκθεσης σε αφλατοξίνες αποκαλούνται οι διάφοροι μεταβολίτες-παράγωγα του μεταβολισμού που υφίσταται η αρχική δόση αφλατοξίνης μέσα στον οργανισμό. Τέτοιοι μεταβολίτες είναι το σύμπλοκο AFM₁-γουανίνης στα ούρα και το σύμπλοκο AFB₁-αλβουμίνης στο πλάσμα του αίματος.

Πριν από αυτούς τους βιοδείκτες, ο πρωταρχικός τρόπος για την εκτίμηση έκθεσης αφλατοξίνης ήταν ο προσδιορισμός κατά μέσο όρο της ποσότητας καλαμποκιού και φιστικιών που καταναλώνονταν από τα άτομα παράλληλα με την μέτρηση των επιπέδων αφλατοξίνης στα τρόφιμα αυτά. Με τη μέτρηση των βιολογικών δεικτών, έγινε δυνατή η βελτίωση των εκτιμήσεων της έκθεσης αφλατοξίνης και του βαθμού βιομετασχηματισμού της, ο οποίος αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου (Groopman και συν., 2008).

Σήμερα, η πιο συνήθης μέθοδος εκτίμησης της έκθεσης του ανθρώπου συνίσταται στην ανάλυση των υγρών του σώματος για την παρουσία βιοδεικτών, αφού κάθε βιοχημική διαδικασία οδηγεί σε παράγωγα τα οποία έχουν ένα χαρακτηριστικό χρόνο ημίσειας ζωής μέσα στο σώμα, και ως εκ τούτου μπορεί να αξιολογηθεί η αρχική έκθεση σε διάστημα ημερών, εβδομάδων ή μηνών.

Η πρόσφατη έκθεση σε αφλατοξίνες αντικατοπτρίζεται στα ούρα, όπου μετριέται η ένωση προσθήκης AFM_1 -γουανίνης. Η παρουσία αυτού του προϊόντος μεταβολισμού δείχνει έκθεση σε αφλατοξίνες κατά τις προηγούμενες 24 ώρες. Ωστόσο, δεν είναι αρκετά καλή μέθοδος, λόγω της διάσπασης της ένωσης προσθήκης με την πάροδο του χρόνου.

Το σύμπλοκο AFB_1 -αλβουμίνης μετριέται στο περιφερικό αίμα, και έχει χρόνο ημίσειας ζωής στον οργανισμό 30-60 ημέρες. Ο προσδιορισμός είναι ακριβέστερος, και είναι θετικός κατά 90% στα θετικά δείγματα, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μακροχρόνιες εκθέσεις, αφού παραμένει θετικός για 2 με 3 μήνες μετά την έκθεση σε αφλατοξίνες. Ωστόσο, πρέπει να υπενθυμίσουμε ότι το κλάσμα της λαμβανόμενης αφλατοξίνης που μεταποιείται σε οποιοδήποτε συγκεκριμένο μεταβολίτη είναι μεταβλητό. Η συνολική ποσότητα αφλατοξίνης που λαμβάνεται διαιρείται σε κλάσματα καθένα από τα οποία ακολουθεί διαφορετικές μεταβολικές οδούς. Το μέγεθος κάθε κλάσματος είναι τυχαίο, με αποτέλεσμα η ποσότητα των μεταβολιτών που δημιουργούνται σε κάθε οδό να είναι και αυτή τυχαία. Επομένως, μια δεδομένη συγκέντρωση ενός συγκεκριμένου βιοδείκτη - μεταβολίτη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να κάνει υποθέσεις σχετικά με τη συνολική δόση ή τα κλάσματά της που κατευθύνονται σε οποιαδήποτε άλλη οδό ανταγωνιστικά (Williams και συν., 2004).

5.3.3 Οξεία τοξικότητα

Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από υψηλό πυρετό, έντονο χρωματισμό ούρων, έμετο, οίδημα των ποδιών, ίκτερο, ταχέως αναπτυσσόμενο ασκίτη, πυλαία υπέρταση και ένα υψηλό ποσοστό θνησιμότητας.

Το 1983 επιβεβαιώθηκαν περιστατικά οξείας τοξικότητας αφλατοξίνης σε πολύ φτωχούς ανθρώπους, οι οποίοι αναγκάστηκαν λόγω οικονομικής συγκυρίας να καταναλώσουν μουχλιασμένο καλαμπόκι που περιείχε αφλατοξίνες μεταξύ 6,25 - 15,6 ppm, με μέση ημερήσια πρόσληψη αφλατοξινών 2 - 6 mg ανά άτομο (Krishnamachari και συν., 1975a).

5.3.4 Χρόνια τοξικότητα

Μακρόχρονη έκθεση σε αφλατοξίνες μέσω της διατροφής αυξάνει τον κίνδυνο, με μια συνεργιστική επίδραση από την αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ. Η αφλατοξίνη B₁ έχει θεωρηθεί ως η κύρια αιτία του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (ΗΚΚ) στον άνθρωπο. Η αφλατοξίνη B₁ συνδέεται χημικά με το DNA και προκαλεί δομικές αλλαγές με αποτέλεσμα τη μετάλλαξη του γονιδιώματος (Groorpan και συν., 1985).

Κατά την παιδική ηλικία, ως πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες της κίρρωσης του ήπατος έχουν θεωρηθεί η κατάποση της αφλατοξίνης, οι ιογενείς ασθένειες, και οι κληρονομικοί παράγοντες. Υπάρχουν αποδείξεις που δείχνουν ότι παιδιά που εκτίθενται σε αφλατοξίνη μέσω του μητρικού γάλακτος και των διατροφικών συνηθειών, όπως ανεπεξέργαστο αραχιδέλαιο, μπορεί να αναπτύξουν κίρρωση του ήπατος. Επίσης, τα υποσιτισμένα παιδιά είναι επιρρεπή σε κίρρωση παιδικής ηλικίας λόγω κατανάλωσης κακής ποιότητας μολυσμένων τροφίμων. Αρκετοί ερευνητές έχουν προτείνει τις αφλατοξίνες ως αιτιολογικό παράγοντα του συνδρόμου Reye στα παιδιά στην Ταϊλάνδη, Νέα Ζηλανδία κλπ. Ωστόσο δεν υπάρχουν πειστικές αποδείξεις ακόμα. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει τη συμμετοχή αφλατοξινών στο σύνδρομο Kwashiorkor κυρίως σε υποσιτισμένα παιδιά. Τα διαγνωστικά χαρακτηριστικά του Kwashiorkor είναι οίδημα, βλάβη στο συκώτι, κλπ. Στον άνθρωπο, αυτές οι αλλαγές από αφλατοξίκωση έχουν αποδοθεί στην κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων, όπως ο αραβόσιτος, αραχίδα, κλπ. Ως εκ τούτου, είναι πολύ σημαντική και απαραίτητη η μείωση της πρόσληψης των αφλατοξινών μέσω της διατροφικής αλυσίδας.

5.3.5 Αφλατοξίνες και παιδιά

Το εμβρυικό περιβάλλον και αυτό κατά την παιδική ηλικία, συμπεριλαμβανομένης της διατροφικής κατάστασης της εγκύου μητέρας και του βρέφους, θεωρούνται κρίσιμα για την ανάπτυξη της νόσου στα πρώτα στάδια της ζωής. Στις αναπτυσσόμενες χώρες ένα από τα κοινά προβλήματα είναι η κακή διατροφή. Εκτός από αυτό, η τροφή εκτίθεται σε υψηλές συγκεντρώσεις μυκοτοξινών. Μεταξύ αυτών, οι κυριότερες μυκοτοξίνες είναι οι αφλατοξίνες.

Έχει αποδειχθεί ότι οι αφλατοξίνες είναι ανοσοκαταστολείς, τερατογενετικές και επιβραδύνουν την ανάπτυξη των πειραματόζωων. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπως η Ινδία, η Κίνα και κάποιες χώρες της Αφρικής, οι περιβαλλοντικές συνθήκες ευνοούν την παραγωγή τους, και ως εκ τούτου λαμβάνει χώρα υψηλή έκθεση του πληθυσμού και φυσικά των παιδιών.

Μια μελέτη στη Δυτική Αφρική έδειξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης αφλατοξίνης και της καχεκτικής ανάπτυξης στα παιδιά που εκτίθενται από τα νεογνικά στάδια της ζωής τους (Gong και συν., 2002). Εκτός από την ικανότητα να διαπερνούν τον πλακούντα, οι αφλατοξίνες μπορούν να προκαλέσουν γενετικές ανωμαλίες κατά τη διάρκεια των ίδιων των εμβρυικών σταδίων (Maxwell και συν., 1998).

Στη θέα της σημασίας των μυκοτοξινών στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές, το Διεθνές Ερευνητικό Ινστιτούτο Σοδειάς για τις Ημι-Άγονες Τροπικές Περιοχές (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics - ICRISAT) έχει αναπτύξει σημαντικές συνεργασίες με διάφορους φορείς για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος. Αξιοποιούνται προσεγγίσεις, όπως η ανάπτυξη ανθεκτικών ποικιλιών, η βιολογική καταπολέμηση, γεωπονικές πρακτικές και η ολοκληρωμένη διαχείριση των αφλατοξινών. Οι πληροφορίες αυτές είναι διαθέσιμες στο ICRISAT και στο διαδίκτυο, ενώ η ανάπτυξη μέσων όπως το διαδίκτυο θα συμβάλει στη μείωση του κινδύνου των αφλατοξινών στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων.

5.3.5.1 Αναστολή αύξησης

Ανάμεσα στις επιδράσεις των αφλατοξινών, εκείνη που αναφέρεται λιγότερο στη βιβλιογραφία είναι η αναστολή της ανάπτυξης στα παιδιά. Η διατροφική έκθεση αφλατοξίνης, ιδίως με το καλαμπόκι και τα αράπικα φιστίκια, είναι κοινή σε μεγάλο μέρος της Αφρικής και της Ασίας - περιοχές όπου ο νανισμός παιδικής ηλικίας και η καχεξία είναι επίσης κοινά, λόγω μιας σειράς αλληλεπιδρώντων παραγόντων, όπως είναι οι εντερικές παθήσεις, η κοινωνικοοικονομική κατάσταση και η ανεπαρκής διατροφή.

Οι επιδράσεις της αφλατοξίνης στην ανάπτυξη των ζώων και των παιδιών ανασκοπήθηκαν, συμπεριλαμβάνοντας τις μελέτες που αξιολογούν την έκθεση σε αφλατοξίνες στη μήτρα και μέσω του θηλασμού. Σε διάφορες περιοχές του κόσμου η διατροφή των παιδιών μετά τον απογαλακτισμό είναι εκτεθειμένη σε αφλατοξίνες, και συνδέεται με την ορθή ανάπτυξη του ήπατος των παιδιών. Στις λιγότερο αναπτυγμένες χώρες, η έκθεση σε αφλατοξίνες συνδέεται άμεσα με την αναστολή της αύξησης των παιδιών, αν και τον κυρίαρχο ρόλο στην αναστολή αυτή έχουν άλλες σημαντικές παράμετροι, όπως ο υποσιτισμός ή άλλες, εντερικές ασθένειες (Khlangwiset και συν., 2011).

5.3.5.2 Kwashiorkor

Ως σύνδρομο Kwashiorkor χαρακτηρίζεται η παθολογική κατάσταση που είναι αποτέλεσμα του πρωτεϊνικού υποσιτισμού κατά την παιδική ηλικία. Προκαλείται από την ανεπαρκή κατανάλωση πρωτεϊνών, παρά την επαρκή πρόσληψη θερμίδων από υδατάνθρακες και λιπίδια, και ενδέχεται να συνδέεται με πρόσληψη αφλατοξίνης (Hendrickse και συν., 1982). Όπως προαναφέρθηκε στο πρώτο κεφάλαιο, η προοδευτικά αυξανόμενη με την πρόσληψη αφλατοξίνης ηπατική βλάβη, μπορεί να καθιστά τα παιδιά αυτά λιγότερο ικανά να ανταπεξέλθουν στις υψηλής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης δίαιτες, που συνήθως χορηγούνται ως θεραπεία του συνδρόμου αυτού (Newell, 1983). Μέχρι σήμερα, από τις έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με τη σύνδεση των αφλατοξινών και του συνδρόμου Kwashiorkor διαπιστώθηκαν τα ακόλουθα:

1. Αφλατοξίνες μπορεί να ανιχνευθούν σημαντικά πιο συχνά και σε υψηλότερες μέσες συγκεντρώσεις στους ορούς των παιδιών που έχουν Kwashiorkor παρά σε υγιή παιδιά.
2. Η αφλατοξικόλη, μεταβολίτης της AFB₁, αν και συχνά εντοπίζεται σε ορούς ασθενών που πάσχουν από το σύνδρομο Kwashiorkor, δεν υπάρχει στους ορούς των υγιών παιδιών.
3. Η AFB₁ και η αφλατοξικόλη έχουν ανιχνευθεί σε όλα τα 57 δείγματα αυτοψίας ήπατος που προέρχονταν από παιδιά που πέθαναν από Kwashiorkor σε διάφορες χώρες στην Αφρική, αλλά ποτέ στο ήπαρ των παιδιών που πέθαναν από άλλες αιτίες.
4. Ο μεταβολισμός των αφλατοξινών σε παιδιά με Kwashiorkor σε σύγκριση με άλλες ομάδες δείχνει διαφορές, ιδιαίτερα όσον αφορά στη μετατροπή της AFB₁ σε λιγότερο τοξικά παράγωγά της, όπως είναι η AFM₁, και στην έκκριση αφλατοξινών μέσω των ούρων· που φαίνονται να έχουν ελαττωθεί στο Kwashiorkor.
5. Αναλύσεις του μητρικού γάλακτος στο Σουδάν, στην Γκάνα, στη Νιγηρία, και στην Κένυα, έχουν αποκαλύψει αφλατοξίνες στο 30% των δειγμάτων· συνήθως μικρές συγκεντρώσεις της μη-τοξικής AFM₁, αλλά περιστασιακά μεγάλες συγκεντρώσεις της μητρικής αφλατοξίνης AFB₁.
6. Τα τρόφιμα στην αγορά, τα αποθηκευμένα τρόφιμα στα σπίτια και τα μαγειρεμένα «τρόφιμα στο πιάτο» έχουν δείξει συχνή και σοβαρή επιμόλυνση με αφλατοξίνες.

7. Εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει ότι ποντίκια των οποίων η τροφή ήταν μολυσμένη με αφλατοξίνες ανέπτυξαν χαμηλότερα επίπεδα παρασιταϊμίας και επιβίωσαν περισσότερο, σε σχέση με ποντίκια των οποίων η τροφή δεν περιείχε αφλατοξίνες, όταν και στις δύο περιπτώσεις χορηγήθηκε ισοδύναμη δόση του πλασμώδιου *Plasmodium berghei*.

Η επιβεβαίωση ότι οι αφλατοξίνες συνδέονται αιτιολογικά με το σύνδρομο Kwashiorkor θα οδηγήσει σε ριζικές αλλαγές στις προσεγγίσεις για την πρόληψη και τη διαχείριση της νόσου.

Ωστόσο, ακόμη και στην περίπτωση που δεν επιβεβαιωθεί κάποιος αιτιώδης ρόλος των αφλατοξινών για τη δημιουργία Kwashiorkor, στοιχεία που έχουν συγκεντρωθεί μέχρι σήμερα δείχνουν ότι τα παιδιά, συμπεριλαμβανομένων των νεογνών, στις τροπικές περιοχές εκτίθενται τακτικά και σοβαρά στις αφλατοξίνες. Οι συνέπειες μιας τέτοιας έκθεσης δεν είναι γνωστές, και απαιτούν επείγουσα διευκρίνιση.

Όσον αφορά στο σύνδρομο Kwashiorkor, πρέπει να αναγνωριστεί ότι η έκθεση σε αφλατοξίνες αποτελεί μεγαλύτερο κίνδυνο για τα παιδιά με τη νόσο, παρά για τα υγιή παιδιά. Μια εξήγηση γι' αυτό μπορεί να είναι ότι στο σύνδρομο Kwashiorkor, μετά από κάποια αρχική προσβολή που καταστρέφει το ήπαρ, η διαταραχή του μεταβολισμού των αφλατοξινών δημιουργεί ένα φαύλο κύκλο στον οποίο συσσωρεύονται αφλατοξίνες, καθώς η ικανότητα να μεταβολίζονται οι τοξίνες αυτές σταδιακά μειώνεται (Hendrickse, 1991).



Εικόνα 5.1. Παιδιά στην Γκάνα που πάσχουν από το σύνδρομο Kwashiorkor

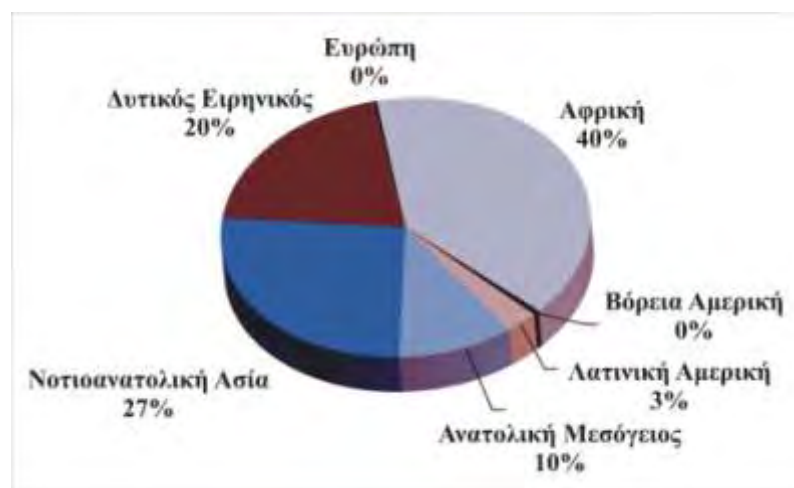
5.3.6 Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα

Σε όλο τον κόσμο, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) ή καρκίνος του ήπατος, είναι η τρίτη συχνότερη αιτία θανάτων από καρκίνο (WHO, 2008). Παγκοσμίως, κάθε χρόνο εμφανίζονται περίπου 550.000 - 600.000 νέες περιπτώσεις ΗΚΚ (Ferlay και συν., 2004). Στις αναπτυσσόμενες χώρες, οι περιπτώσεις εμφάνισης ΗΚΚ είναι 16-32 φορές υψηλότερες από ό, τι στις αναπτυγμένες χώρες. Η έκθεση στην αφλατοξίνη μέσω μολυσμένων τροφίμων είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για το ΗΚΚ (Wild και Gong, 2010).

Οι Liu και Wu (2010), σε μια βιβλιογραφική ανασκόπηση, προσπάθησαν να αναδείξουν τη σημασία της έκθεσης σε αφλατοξίνες για τη δημιουργία του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος σε παγκόσμια κλίμακα.

Από τα 550.000 - 600.000 νέα κρούσματα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος σε όλο τον κόσμο κάθε χρόνο, περίπου 25.200 - 155.000 μπορούν να αποδοθούν στην έκθεση σε αφλατοξίνες. Οι περισσότερες περιπτώσεις λαμβάνουν χώρα στην υποσαχάρια Αφρική, τη Νοτιοανατολική Ασία, την Κίνα, και όπου οι πληθυσμοί πλήττονται, τόσο από υψηλό επιπολασμό ηπατίτιδας Β, όσο και από ανεξέλεγκτη έκθεση των τροφίμων σε αφλατοξίνες.

Οι αφλατοξίνες δηλαδή μπορούν και διαδραματίζουν έναν αιτιολογικό ρόλο στο 4,6 έως 28,2 % των περιπτώσεων ηπατοκυτταρικού καρκινώματος παγκοσμίως.



Εικόνα 5.2. Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε αφλατοξίνες (Liu και Wu, 2010)

6. ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ

6.1 Διατροφική έκθεση σε αφλατοξίνες

Έχουν εντοπιστεί δύο μονοπάτια διατροφικής έκθεσης:

- 1) Η άμεση πρόσληψη των αφλατοξινών (κυρίως B₁) από μολυσμένα τρόφιμα φυτικής προέλευσης, όπως ξηρούς καρπούς, καθώς και δημητριακά και προϊόντα αυτών.
- 2) Η κατάποση των αφλατοξινών που μεταφέρθηκαν από ζωοτροφές στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως είναι το τυρί και το γάλα σε σκόνη, όπου εμφανίζονται κυρίως ως αφλατοξίνη M₁. Πέρα από τη μεταφορά τους στο γάλα, τα κατάλοιπα των αφλατοξινών μπορεί να είναι παρόντα και στους ιστούς των ζώων που καταναλώνουν μολυσμένες ζωοτροφές (WHO, 1979). Κατάλοιπα αφλατοξίνης έχουν βρεθεί σε ιστούς ζώων, αυγά και πουλερικά μετά την πειραματική κατάποση μολυσμένων με αφλατοξίνη ζωοτροφών. Η μόλυνση του γάλακτος, των αυγών και του κρέατος μπορεί να προκύψει από την κατανάλωση ζωοτροφών μολυσμένων με μυκοτοξίνες. (Dhanasekaran και συν., 2011)

6.2 Επαγγελματική έκθεση σε αφλατοξίνες

Η επαγγελματική έκθεση σε αφλατοξίνες λαμβάνει χώρα με την εισπνοή σκόνης που δημιουργείται κατά το χειρισμό και την επεξεργασία των μολυσμένων φυτών και ζωοτροφών. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί οξείες και χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού μετά την εισπνοή οργανικής σκόνης που περιείχε αφλατοξίνη (Bünger και συν., 2004).

Οι αγρότες, και άλλοι εργαζόμενοι που χειρίζονται τα αγροτικά προϊόντα, έχουν το μεγαλύτερο κίνδυνο επαγγελματικής έκθεσης. Υψηλός κίνδυνος επαγγελματικής έκθεσης διαπιστώθηκε σε αγρότες, οι οποίοι εισέπνεαν αιωρούμενες αφλατοξίνες από τη σκόνη δημητριακών. Παρόμοιο κίνδυνο διατρέχουν και οι εργαζόμενοι σε βιομηχανίες φιστικιών, σε εκτροφές ζώων, σε μύλους ρυζιού και σε βιομηχανίες επεξεργασίας του καλαμποκιού (ΕΛ.ΙΝ.Υ.Α.Ε., 2007).

Το φάσμα των επιπτώσεων της επαγγελματικής έκθεσης στις αφλατοξίνες:

- καρκινογόνος δράση, π.χ. στον πνεύμονα, το ήπαρ, τους νεφρούς και το λάρυγγα
- γονιδιατοξικές ή / και μεταλλαξιογόνες επιδράσεις
- τοξικές επιδράσεις σε όργανα-στόχους, όπως οι νεφροί, το ήπαρ και το νευρικό σύστημα

- τερατογόνος δράση
- ανοσοκατασταλτική δράση (Mayer και συν., 2008)

Στη Δανία, σε εργοστάσιο παραγωγής ζωοτροφών, σε 7 από τους 45 εργαζόμενους παρατηρήθηκαν στο αίμα ανιχνεύσιμα επίπεδα αφλατοξίνης B₁ (Autrup και συν., 1993). Τα δείγματα αίματος λήφθηκαν τόσο μετά την επιστροφή τους από διακοπές, όσο και μετά από τέσσερις εβδομάδες εργασίας. Η μέση ημερήσια πρόσληψη βρέθηκε να είναι 64 ng / kg σωματικού βάρους. Το επίπεδο αυτό έκθεσης θα μπορούσε να εξηγήσει εν μέρει τον αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του ήπατος σε εργαζόμενους στον τομέα της βιομηχανικής μεταποίησης ζωοτροφών.

Κατά την εκφόρτωση πλοίων, αφλατοξίνη B₁ βρέθηκε στο έρμα τους, σε επίπεδα έως και 300 ng/m³ (Lafontaine και συν., 1994).

Σε εργοστάσια τροφίμων, οι Kussak και συν. (1995) έδειξαν την παρουσία αφλατοξινών σε αερομεταφερόμενη σκόνη.

Στην Ινδία, εντοπίστηκαν συγκεντρώσεις αφλατοξινών 0,00002 - 0,0008 μg/m³ σε δείγματα αναπνεύσιμης σκόνης, που συλλέχτηκε από το χώρο εργασίας και τους αποθηκευτικούς χώρους εγκαταστάσεων μεταποίησης ρυζιού και καλαμποκιού (Ghosh και συν. 1997). Τα επίπεδα της αερομεταφερόμενης αφλατοξίνης ήταν πάντοτε υψηλότερα στα δείγματα αναπνεύσιμης σκόνης, παρά στα δείγματα συνολικής σκόνης.

Δείγματα σκόνης που συλλέχθηκαν από 28 αγροκτήματα των ΗΠΑ κατά τη διάρκεια της συγκομιδής και της εκφόρτωσης, τη διατροφή των ζώων και τον καθαρισμό των κάδων, περιείχαν αφλατοξίνες σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0,00004 έως 4,8 μg/m³ (Selim και συν., 1998). Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις εντοπίστηκαν κατά τη διάρκεια της συγκομιδής και της εκφόρτωσης ενώ οι υψηλότερες κατά τη διάρκεια του καθαρισμού των κάδων.

Σε μια μελέτη σε εργοστάσια της Ταϊλάνδης (Nuntharatanapong και συν., 2001), αναλύθηκαν δείγματα αερομεταφερόμενης σκόνης που δημιουργείται κατά το χειρισμό των ζωοτροφών, προκειμένου να εκτιμηθεί η έκθεση των εργαζομένων σε αφλατοξίνες. Το μέσο επίπεδο αφλατοξίνης σε δείγματα αέρα αναφοράς ήταν 0,99 ng/m³. Υψηλότερα επίπεδα αφλατοξινών παρατηρήθηκαν στα δείγματα αέρα που λήφθηκαν από πέντε εργαζομένους που πρόσθεταν ένυδρο νατριούχο ασβεστόχο αργιλοπυριτικό άλας σε ζωοτροφές (1,55 ng/m³), και πέντε εργαζομένους που πρόσθεταν γλυκομανάνη, ένα παχύρρευστο πολυσακχαρίτη, στις ζωοτροφές (6,25 ng/m³). Οι εκτεθειμένοι

εργαζόμενοι είχαν τροποποιημένη ισοενζυμική δραστικότητα της γαλακτικής αφυδρογονάσης και των επιπέδων του παράγοντα νέκρωσης όγκων στο πλάσμα. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να σχετίζονται με την εισπνοή μυκοτοξινών και άλλων μολυσματικών ουσιών στα τρόφιμα.

Τόσο προσωπικοί δειγματολήπτες, όσο και δειγματολήπτες πεδίου χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων αιωρούμενων αφλατοξινών B₁, B₂, G₁ και G₂ σε δείγματα σκόνης από τρεις μονάδες μεταποίησης φυτικών τροφίμων (για το κακάο, τον καφέ και μπαχαρικά), στην Τοσκάνη της Ιταλίας. Οι συγκεντρώσεις κυμαίνονταν κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης (<0,000002 μg/m³ έως 0,00013 μg/m³) (Brera και συν. 2002).

Τέλος, σε έρευνα που έγινε σε γεωργικές εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφών στις Φιλιππίνες, τα επίπεδα αφλατοξίνης σε εναποτιθέμενες σκόνες ήταν τα ίδια με εκείνα που βρέθηκαν στις αιωρούμενες σκόνες Λαμβάνοντας υπόψη την τρέχουσα κατάσταση των επαγγελματικών συνθηκών στον τομέα της γεωργίας στις Φιλιππίνες, είναι πολύ πιθανό ότι οι εργαζόμενοι εκτίθενται σοβαρά σε μολυσμένες από αφλατοξίνες σκόνες (Sales και Yoshizawa, 2006).

Για την αξιολόγηση των συνεπειών της έκθεσης του ανθρώπου στις αφλατοξίνες πρέπει να ληφθούν υπόψη πολυάριθμοι παράγοντες.

Πρώτον, όλη η αφλατοξίνη που καταναλώνεται δεν είναι βιολογικά σημαντική - υπάρχει ένα ποσοστό της προσλαμβανόμενης αφλατοξίνης το οποίο κάθε φορά αποτοξινώνεται, και το οποίο είναι μεταβλητό - , και η έκθεση μπορεί να επηρεάσει διαφορετικά τα διάφορα βιολογικά συστήματα, σύμφωνα με το κλάσμα που ακολουθεί κάθε μεταβολικό μονοπάτι (Williams και συν., 2004).

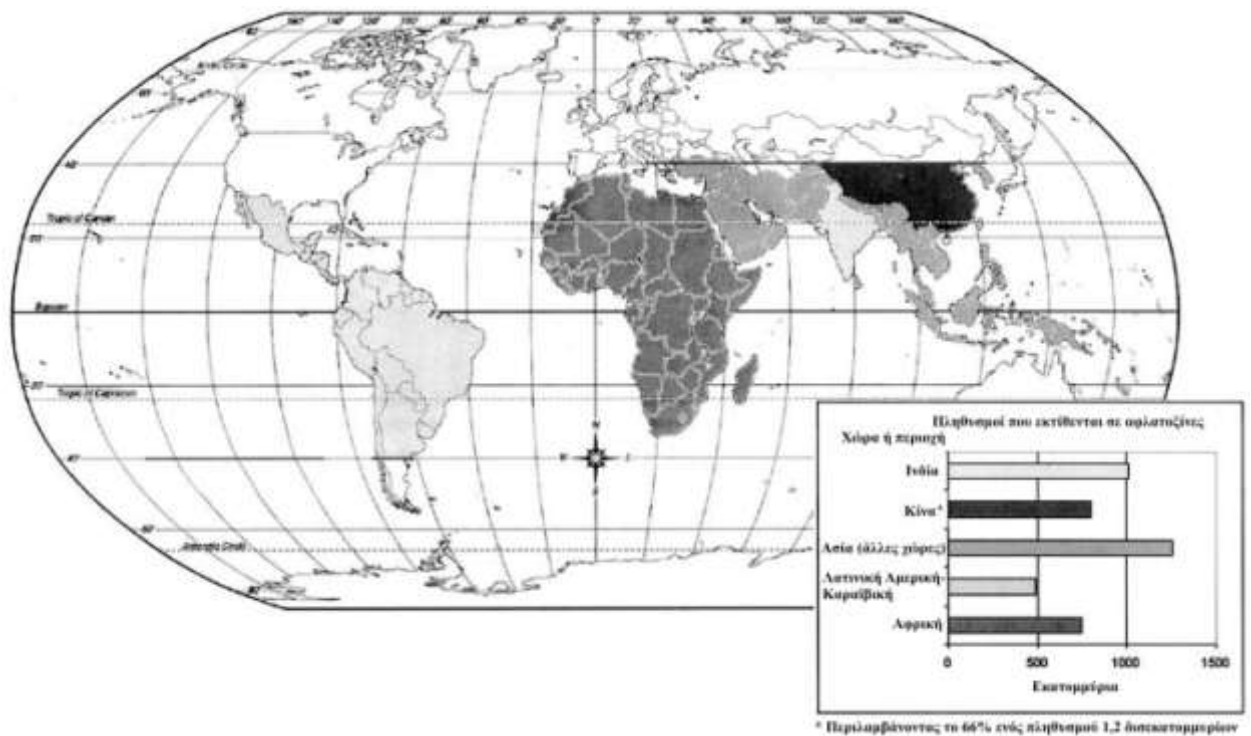
Δεύτερον, άλλες πτυχές της διατροφής μπορεί να έχουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των συνεπειών κατάποσης αφλατοξίνης. Σε πολλά είδη ζώων, οι τοξικότητες της αφλατοξίνης μπορεί να τροποποιηθούν από τις διαιτητικές προσλήψεις αντιοξειδωτικών βιταμινών, όπως οι βιταμίνες A, C και E. Η αφλατοξίνη B₁ μειώνει σημαντικά το επίπεδο της γλουταθειόνης και τις δραστηριότητες της υπεροξειδικής δισμουτάσης και GPx, και αυξάνει τα επίπεδα της μαλονδιαλδεΰδης. Ταυτόχρονη συμπλήρωση της δίαιτας με βιταμίνες A, C και E αποκαθιστά αυτές τις παραμέτρους στα φυσιολογικά όρια. Εν κατακλείδι, οι βιταμίνες A, C και E παρουσίασαν προστατευτική δράση στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, αναστέλλοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) που προκαλείται από την AFB₁.

Τρίτον, το ποσό της βιολογικής έκθεσης εξαρτάται από τη μόλυνση με τους ιούς της ηπατίτιδας B και C (HBV και HCV), και, ενώ το φαινόμενο αυτό έχει μελετηθεί για την επίδρασή του στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, δεν έχει αξιολογηθεί για άλλες γνωστές τοξικότητες της αφλατοξίνης (Williams και συν., 2004).

6.3 Η γεωγραφική κατανομή της χρόνιας έκθεσης του ανθρώπου σε αφλατοξίνες

Τα δεδομένα σχετικά με τις συνθήκες θερμοκρασίας που απαιτούνται για τη σύνθεση της αφλατοξίνης, η ευπάθεια των κύριων προϊόντων στη μόλυνση, τα συστήματα παραγωγής τροφίμων, αποθήκευσης και εμπορίας και οι αποτυχίες εφαρμογής των κανονισμών κατά της μόλυνσης από αφλατοξίνες, δείχνουν ότι στις αναπτυσσόμενες χώρες υπάρχει κίνδυνος χρόνιας έκθεσης σε αφλατοξίνες μεταξύ 40° B και 40° N του ισημερινού.

Τα πληθυσμιακά δεδομένα από τη βάση δεδομένων του Διεθνούς Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) δείχνουν ότι 4,5 δισεκατομμύρια άνθρωποι ζουν σε αυτή τη ζώνη. Τα δεδομένα που αφορούν τη μόλυνση στα εμπορεύσιμα τρόφιμα, και τα αποτελέσματα βιοπαρακολούθησης του πληθυσμού, δείχνουν ότι το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού είναι πιθανό ότι εκτίθεται στις αφλατοξίνες (Εικόνα 6.1), αλλά συνήθως σε επίπεδο μικρότερο από αυτό που απαιτείται για την άμεση οξεία φάση της ασθένειας και του θανάτου (Williams και συν., 2004).



Εικόνα 6.1. Περιοχές και πληθυσμοί με κίνδυνο χρόνιας έκθεσης σε αφλατοξίνη (Williams και συν., 2004)

Όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 3, στις αφρικανικές και ασιατικές χώρες, όπου οι περιβαλλοντικές συνθήκες ευνοούν το επίπεδο επιμόλυνσης από αφλατοξίνες, η απειλή για την ανθρώπινη υγεία από τις αφλατοξίνες είναι σοβαρή. Ο Πίνακας 6.1. δείχνει την έκθεση στην αφλατοξίνη M_1 , μέσω της κατανάλωσης γάλακτος, σε διαφορετικές χώρες από όλο τον κόσμο.

Ο πίνακας 6.2 παρουσιάζει την κατανάλωση φιστικιών και καλαμποκιού σε διάφορες χώρες. Η Αφρική παρουσιάζει τις μεγαλύτερες τιμές, με αποτέλεσμα και την αύξηση της πιθανότητας έκθεσης σε αφλατοξίνες. Τόσο η κατανάλωση, όσο και τα χαρακτηριστικά του κλίματος που ευνοούν την ανάπτυξη μυκοτοξινών, παράλληλα φυσικά με την έλλειψη προστατευτικών μέτρων σε πολλές από τις χώρες τις Αφρικής, συντελούν στο κρίσιμο όριο απειλής για την υγεία σε ολόκληρη την ήπειρο.

Πίνακας 6.1. Εκτιμώμενη πιθανή ημερήσια έκθεση στην αφλατοξίνη M₁, μέσω της κατανάλωσης γάλακτος σε διαφορετικές περιοχές (IARC, 2002)

Περιοχή / έκθεση	Αφλατοξίνη M ₁ στο γάλα (μg/kg)	Κατανάλωση αφλατοξίνης M ₁ (ng/άτομο/ημέρα)
Ευρώπη/ΗΠΑ/Καναδάς (0.294 kg γάλα/ημέρα)		
Προτεινόμενο μέγιστο όριο	0,05	14,7
Τρέχον μέγιστο όριο	0,5	147,0
Σταθμισμένος μέσος όρος	0,023	6,8
Λατινική Αμερική (0.160 kg γάλα/ημέρα)		
Προτεινόμενο μέγιστο όριο	0,05	8,0
Τρέχον μέγιστο όριο	0,5	80,0
Σταθμισμένος μέσος όρος	0,022	3,5
Άπω ανατολή (0.032 kg γάλα/ημέρα)		
Προτεινόμενο μέγιστο όριο	0,05	1,6
Τρέχον μέγιστο όριο	0,5	16,0
Σταθμισμένος μέσος όρος	0,36	12
Μέση Ανατολή (0.116 kg γάλα/ημέρα)		
Προτεινόμενο μέγιστο όριο	0,05	5,8
Τρέχον μέγιστο όριο	0,5	58,0
Σταθμισμένος μέσος όρος	0,005	0,6
Αφρική (0.042 kg γάλα/ημέρα)		
Προτεινόμενο μέγιστο όριο	0,05	2,9
Τρέχον μέγιστο όριο	0,5	20,9
Σταθμισμένος μέσος όρος	0,002	0.1

Πίνακας 6.2. Κατανάλωση καλαμποκιού και φιστικιών σε επιλεγμένες χώρες (IARC, 2002)

WHO περιοχή / χώρα	Καλαμπόκι (g / άτομο / ημέρα)	Φιστίκια (g / άτομο / ημέρα)
Αφρική		
Δημοκρατία του Κονγκό	57	52
Αιθιοπία	83	13
Γκάμπια	57	52
Κένυα	248	11
Μοζαμβίκη	248	11
Νιγηρία	57	52
Νότιος Αφρική	248	11
Τανζανία	248	11
Ζιμπάμπουε	248	11
Βόρεια Αμερική και Λατινική Αμερική		
Καναδάς	86	17
Ηνωμένες Πολιτείες	86	17
Αργεντινή	86	17
Βραζιλία	63	2
Μεξικό	300	5
Ανατολική Μεσόγειος		
Αίγυπτος	136	5
Ιράν	32	2
Πακιστάν	35	18
Σουδάν	57	52
Νοτιοανατολική Ασία		
Ινδία	35	18
Ινδονησία	35	18
Ταϊλάνδη	35	18
Δυτικός Ειρηνικός		
Αυστραλία	86	17
Κίνα	35	18
Μαλαισία	35	18
Φιλιππίνες	59	2
Κορέα	59	2
Ευρώπη		
Ανατολική Ευρώπη	32	2–10
Νότια Ευρώπη	148	7
Δυτική Ευρώπη	33	10

Ο Πίνακας 6.3. παρουσιάζει δεδομένα σχετικά με την παρουσία της αφλατοξίνης M₁ στο γάλα από έρευνες που έγιναν σε διαφορετικές χώρες.

Πίνακας 6.3. Παρουσία της αφλατοξίνης M₁ στο γάλα (IARC, 2002)

Περιοχή	Αριθμός θετικών / αριθμός δειγμάτων	Διακύμανση της συγκέντρωσης αφλατοξίνης M ₁ (μg/kg)
Βραζιλία	4/52	0.05–0.37
Κούβα	22/85	> 0.5
Κύπρος	11/112	0.01–0.04
Γαλλία	5284/5489	< 0.05
	200/5489	0.05–0.5
	5/5489	> 0.5
	0/562	–
Ελλάδα	3/81	0.05–0.18
Ινδία	89/504	0.1–3.5
Ιταλία	122/214	0.003–0.101
Ιαπωνία	0/37	–
Κορέα	50/134	0.05–0.28
Ισπανία	29/155	0.015–0.04
Ταϊλάνδη	58/310	0.5–6.6
Ευρώπη	314/7573	≤ 0.05

6.3.1 Αφρική

Η μόλυνση με αφλατοξίνη των γεωργικών καλλιεργειών είναι διαδεδομένη στην Αφρική, και η συνειδητοποίηση αυτής της κατάστασης υπάρχει σε όλη την ήπειρο. Ωστόσο, η ανεπάρκεια του εφοδιασμού σε τρόφιμα είναι ένα σημαντικό εμπόδιο στη βελτίωση της ασφάλειας των τροφίμων. Η αυξημένη πίεση στους περιορισμένους πόρους τροφίμων και ο υποσιτισμός που τη συνοδεύει επιδεινώνει το πρόβλημα των μυκοτοξινών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της πιθανότητας ανθρώπινης

κατανάλωσης των μολυσμένων τροφίμων, και καθιστά αυτούς τους πληθυσμούς ευάλωτους, με δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία τους.

Εκτός από την έρευνα σχετικά με τη φυσική παρουσία αφλατοξινών, ένας αριθμός επιστημόνων έχουν εξετάσει τη χρήση ιθαγενών φυτών της Αφρικής, ως φυσικά προστατευτικά κατά της ζημίας από έντομα και μύκητες κατά την αποθήκευση των τροφών. Παρ' όλα αυτά, η χρήση αυτή θα πρέπει να αξιολογηθεί προσεκτικά, καθώς οι πρακτικές αυτές μπορεί να επιδεινώσουν το επίπεδο μόλυνσης αφλατοξινών.

Οι επιπτώσεις των παραδοσιακών εγχώριων τεχνικών αγροτικής μεταποίησης τροφίμων ως δυνατά μέσα απολύμανσης, επίσης, έχουν διερευνηθεί στη Ζάμπια, τη Νιγηρία και την Γκάνα, και πρέπει να εξεταστούν περαιτέρω.

Σε διεθνές συνέδριο με θέμα τις μυκοτοξίνες, που πραγματοποιήθηκε στο Κοτονού, Μπενίν, το Νοέμβριο του 1995, εγκρίθηκε ψήφισμα που εξέφραζε τις ανησυχίες των Αφρικανών επιστημόνων με αντικείμενο τη γεωργία και τη βιοϊατρική, όσον αφορά στην έκθεση σε μυκοτοξίνες σε χώρες της Αφρικής, και την ανάγκη για λήψη των κατάλληλων μέτρων από την πλευρά των κυβερνήσεων. Αυτό το ψήφισμα αποσκοπούσε στην προώθηση της συνειδητοποίησης της ανάγκης για συντονισμένη δράση για την αντιμετώπιση των θεμάτων αυτών στην αφρικανική ήπειρο (Shephard, 2003).

6.3.2 Νότια Αμερική

Ορισμένες χώρες της Νότιας Αμερικής (Βραζιλία, Αργεντινή, Ουρουγουάη, Βενεζουέλα και Κολομβία), παρά τους περιορισμούς στους ανθρώπινους και υλικούς πόρους, αντιμετωπίζουν τις ανάγκες της περιοχής, με την παρακολούθηση των επιπέδων των αφλατοξινών. Ωστόσο, οι ερευνητικές δραστηριότητες πρέπει να επεκταθούν και σε άλλες χώρες της Νοτίου Αμερικής. Δεδομένα για την έκθεση σε αφλατοξίνες με τη χρήση βιοδεικτών έκθεσης έχουν καταγραφεί μόνο στη Βραζιλία.

Η μόλυνση των πρώτων υλών και μεταποιημένων τροφίμων που καταναλώνονται από τον πληθυσμό της Νότιας Αμερικής είναι μια πραγματικότητα. Ως εκ τούτου, η επιστημονική κοινότητα της Νότιας Αμερικής πρέπει να εξετάσει την αξιολόγηση των επιπέδων έκθεσης του ανθρώπου στην αφλατοξίνη B₁ (AFB₁) μέσω βιοδεικτών. Η τεχνική αυτή φαίνεται να παρέχει βελτιωμένη αξιοπιστία, σε σύγκριση με την αξιολόγηση της έκθεσης μέσω της ανίχνευσης των αφλατοξινών στα τρόφιμα. Είναι αναγκαίο να καθοριστούν κανόνες και μετρήσεις ελέγχου των αφλατοξινών σε όλες τις

χώρες της Νότιας Αμερικής, προκειμένου να προστατευθεί η υγεία του πληθυσμού και να προωθηθεί το θεμιτό εμπόριο σε διεθνές επίπεδο.

Τα διαθέσιμα στοιχεία που αφορούν τις μυκοτοξίνες στη Λατινική Αμερική και την Καραϊβική είναι ανεπαρκή. Ωστόσο, προκειμένου να επιτευχθεί η πρόληψη και ο έλεγχος των μυκοτοξινών για την ελαχιστοποίηση των κινδύνων τους, απαιτούνται προσπάθειες, οι οποίες θα επιτρέψουν την ορθή χρησιμοποίηση των ανεπαρκών πόρων. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η δημιουργία ενός τοπικού δικτύου, τόσο για τη διάδοση των πληροφοριών, όσο και την κατάρτιση του προσωπικού σε περιφερειακή βάση. Στο πλαίσιο ενός τέτοιου δικτύου, θα μπορούσε να δημιουργηθεί μια βάση δεδομένων για την τεκμηρίωση και τη διάδοση των πληροφοριών. Μια τέτοια βάση δεδομένων θα μπορούσε να περιλαμβάνει, ανά χώρα, το προφίλ των οργανώσεων, των ομάδων και των ατόμων που εργάζονται σε περιβάλλοντα επιμολυσμένα μυκοτοξίνες, τα στοιχεία για τις μυκοτοξίνες στον τομέα των γεωργικών προϊόντων, στις εισαγωγές / εξαγωγές, καθώς και στο εσωτερικό εμπόριο.

Επίσης, πρέπει να βελτιωθούν οι μελέτες δια- και ενδο- εργαστηριακής συνεργασίας για άλλες μυκοτοξίνες που επιμολύνουν τα τρόφιμα, και για διάφορα προϊόντα. Ένα τέτοιο βήμα θα εξασφαλίσει την εμπιστοσύνη, όχι μόνο μεταξύ των διεθνών αγοραστών των γεωργικών προϊόντων που ενδέχεται να έχουν μολυνθεί με μυκοτοξίνες, αλλά και μεταξύ του προσωπικού των εργαστηρίων που ασχολούνται με την ανάλυση αυτών των τοξινών. Είναι προφανές ότι πρέπει να εφαρμοστεί ένα κατάλληλο σχέδιο δειγματοληψίας, προκειμένου να αξιολογηθεί η συχνότητα και το επίπεδο της μόλυνσης. Από την άλλη πλευρά, προκύπτουν διάφορα προβλήματα, επειδή ορισμένες χώρες εισάγουν πρώτες ύλες για την παρασκευή τροφίμων και ζωοτροφών, όπως η Αντίγκουα και η Μπαρμπούντα, τα Μπαρμπάντος και η Τζαμάικα, ενώ άλλες είναι εξαγωγείς, όπως η Αργεντινή, η Βραζιλία ή η Χιλή. Το κοινό πρόβλημα είναι η εναρμόνιση των κανονισμών για τις μυκοτοξίνες, μεταξύ διαφορετικών χωρών.

Επίσης, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί περισσότερη έρευνα πάνω στην ελαχιστοποίηση της μόλυνσης από μυκοτοξίνες, τόσο πριν, όσο και μετά τη συγκομιδή. Η εφαρμογή ορθών πρακτικών αποθήκευσης θα μειώσει σημαντικά τον κίνδυνο δηλητηρίασης του ανθρώπου και των ζώων.

Η εφαρμογή κοινών πρακτικών παραγωγής και μεταποίησης των τροφίμων και των ζωοτροφών θα καταστήσει δυνατή τη βελτιστοποίηση αυτών των διαδικασιών για την ελαχιστοποίηση της μόλυνσης. Η ανάπτυξη νέων προϊόντων ή πρακτικών, και νέων

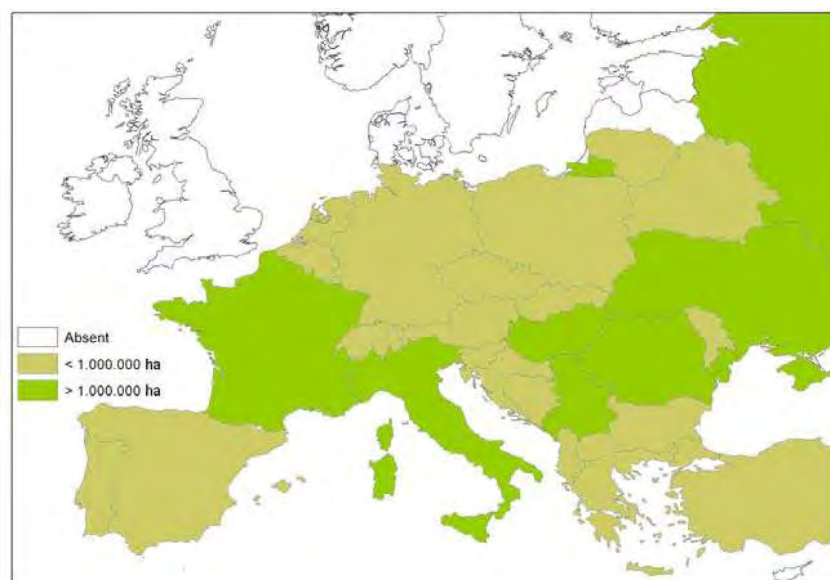
μεθόδων αποτοξίνωσης, αποτελούν επίσης προτεραιότητες, διότι δεν είναι δυνατό να αποφευχθεί η μόλυνση.

Μεταξύ άλλων, είναι αναγκαίο να αξιολογηθούν οι οικονομικές επιπτώσεις αυτής της φυσικής μόλυνσης, προκειμένου να τονωθεί οικονομικά το εμπόριο της περιοχής. Στον τομέα της πρόληψης και του ελέγχου της μόλυνσης από μυκοτοξίνες υπάρχει πολύς δρόμος που πρέπει να διανυθεί, οι δε προσπάθειες που πρέπει να γίνουν για τη διαφύλαξη της ανθρώπινης υγείας και την αποφυγή σοβαρών οικονομικών απωλειών είναι αναγκαίο να διπλασιαστούν. (Resnik και συν., 1995).

6.3.3 Ευρώπη

Η Οδηγία της ΕΕ 2002/32/ΕΚ, σχετικά με τις ανεπιθύμητες ουσίες στις ζωοτροφές, προσδιορίζει «αραχίδες, κόπρα, φοινικοπυρηνέλαιο, βαμβακέλαιο, babassu, αραβόσιτος, και τα προϊόντα που προέρχονται από την επεξεργασία τους», ως ειδικά ονομαζόμενα συστατικά των ζωοτροφών, και ως εκ τούτου για τα υλικά αυτά υπάρχει η πιθανότητα μόλυνσης τους από αφλατοξίνες, και αναλόγως εφαρμόζεται ένα συγκεκριμένο όριο.

Η εικόνα 6.2. δείχνει την Ευρωπαϊκή διανομή της καλλιέργειας καλαμποκιού, και σε συνδυασμό με τις κλιματικές συνθήκες, αιτιολογεί τον αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης του καλαμποκιού και έκθεσης του καταναλωτή στην Ιταλία.



Εικόνα 6.2. Ευρωπαϊκή διανομή της καλλιέργειας καλαμποκιού

Ο πίνακας 6.4. δείχνει ότι τα μπαχαρικά, που κατά κύριο λόγο εισάγονται στην Ευρώπη από χώρες της Ασίας, είναι από τους κύριους φορείς αφλατοξίνης στην Ευρωπαϊκή ήπειρο. Σημαντική παρατήρηση είναι ότι περίπου το 20% των εισαγόμενων μπαχαρικών έχει συγκέντρωση αφλατοξίνης μεγαλύτερη των 2 µg/kg.

Πίνακας 6.4. Αφλατοξίνη B₁ σε μπαχαρικά που εισάγονται στην Ευρωπαϊκή Ένωση (IARC, 2002)

Προϊόν	Ανιχνεύσιμα/ σύνολο δειγμάτων	Αφλατοξίνη B ₁ (µg/kg)	
		> 2	> 10
Μοσχοκάρυδο	333/546	25%	8%
Πιπέρι	282/828	7%	1%
Τσίλι και τσίλι σε σκόνη	148/509	28%	9%
Σκόνη πάπρικας	195/1215	21%	7%
Σύνολο	958/3098	> 1 µg/kg	
	591/3098	> 2 µg/kg	
	183/3098	> 10 µg/kg	

Οι Verger και συν. (1999) υπολόγισαν την έκθεση στην αφλατοξίνη M₁ του πληθυσμού της Γαλλίας (Πίνακας 6.5).

Πίνακας 6.5. Εκτιμώμενη κατανάλωση αφλατοξίνης M₁ στη Γαλλία

Προϊόν	Αφλατοξίνη (µg/kg)	ng/ημέρα per kg body weight
		Μέσος όρος
Γάλα	0.014	0.048
Τυριά	0.093	0.058
Σύνολο	—	0.142

Οι εθνικές έρευνες με αντικείμενο τα συστατικά των ζωοτροφών που εισάγονται ή διακινούνται στην ΕΕ, αναφέρονται σε έναν υψηλό βαθμό συμμόρφωσης με την ισχύουσα νομοθεσία. Αυτό επιβεβαιώνεται από στοιχεία για την παρουσία αφλατοξίνης M₁ στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα, που δείχνουν ένα εξίσου χαμηλό

επίπεδο υπέρβασης (0,06%) του νόμιμου ορίου, ακόμη και με γάλα από ατομικές φάρμες (1,8% υπέρβαση). Συνεπώς, τα τρέχοντα μέγιστα επίπεδα αφλατοξίνης B₁ στις ζωοτροφές, όχι μόνο παρέχουν επαρκή προστασία από τις δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία των ζωικών ειδών, αλλά - το πιο σημαντικό - φαίνεται να εμποδίζουν επιτυχώς τις ανεπιθύμητες συγκεντρώσεις αφλατοξίνης M₁ στο γάλα.

Όπως έγινε γενικά αποδεκτό ότι ο κίνδυνος για μόλυνση με αφλατοξίνη B₁ είναι μεγάλος σε γεωγραφικές περιοχές με τροπικό ή υποτροπικό κλίμα, έτσι και η παρακολούθηση των συστατικών των ζωοτροφών για την παρουσία αφλατοξίνης B₁ εστιάστηκε στις εισαγόμενες τροφές και ζωοτροφές.

Ωστόσο, το 2003, η Ιταλία παρουσίασε για πρώτη φορά αύξηση του αριθμού των δειγμάτων γάλακτος που υπερβαίνει το νόμιμο όριο. Οι υψηλότερες τιμές μόλυνσης συνδέονταν με υψηλή μόλυνση της τοπικής παραγωγής καλαμποκιού που χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή (EFSA, 2004).

Στην Ιταλία, μετά το ξέσπασμα της μόλυνσης από AFB₁ στον αραβόσιτο, που σημειώθηκε το 2003, και την επακόλουθη διαπίστωση της AFM₁ στο γάλα, το Υπουργείο Υγείας καθόρισε ως ανώτατη επιτρεπτή τιμή των μυκοτοξινών στα σκληρά, μακρόχρονης ωρίμανσης τυριά, την τιμή των 0,45 μg/kg (450ppb). Αυτή η τιμή, αν και θεωρήθηκε ως προσωρινό μέτρο για την αντιμετώπιση της κρίσης, δεν έχει αλλάξει από τότε, και κάποιοι συγγραφείς την έχουν χρησιμοποιήσει ως την κατώτατη τιμή για τη μόλυνση των τυριών από AFM₁. Ωστόσο, είναι πολύ υψηλότερη από εκείνες που θεσπίζονται σε άλλα κράτη: 0,25 μg/kg στην Ελβετία, το Ιράν και την Τουρκία, 0,20 μg/kg στην Ολλανδία. Εξακολουθεί να λείπει ένα κοινό ευρωπαϊκό πρότυπο το οποίο θα εφαρμόζεται σε όλα τα κράτη μέλη (Montagna και συν., 2008).

6.3.4 Ελλάδα

Αν και η χώρα μας βρίσκεται στο νότιο τμήμα της Ευρώπης, όπου το κλίμα ευνοεί την ανάπτυξη αφλατοξινών, τόσο στο καλαμπόκι, όσο και στα κελυφωτά φιστίκια (τύπου Αιγίνης), πέρα από κάποιες μελέτες που αφορούν την αφλατοξίνη M₁ στο γάλα (π.χ. Roussi και συν., 2002· Kourousekos και Lymberopoulos, 2007· Kourousekos και συν., 2012), οι επιδημιολογικές έρευνες απουσιάζουν.

Οι επιδράσεις των αφλατοξινών στην υγεία, σε συνδυασμό με την αυξημένη εισαγωγή προϊόντων, όπως ζωοτροφές, μπαχαρικά και ξηροί καρποί, από χώρες ιδιαίτερα της Ανατολής, όπως η Κίνα και η Ινδία, κάνουν την ανάγκη επιδημιολογικών ερευνών από ειδικούς επιστήμονες επιτακτική.

7. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ

7.1 Προληπτικά μέτρα και αφλατοξίνες

7.1.1 Προληπτικά μέτρα πριν τη συγκομιδή

Τα επίπεδα των αφλατοξινών που προκαλούν ανησυχία μειώνονται συνεχώς και είναι δύσκολο να παραχθούν προϊόντα απαλλαγμένα από αυτές τις εξαιρετικά μικρές ποσότητες αφλατοξινών. Μια πιο ορθολογική και οικονομική προσέγγιση ελέγχου των αφλατοξινών είναι η εξάλειψή τους πριν από τη συγκομιδή. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τους ακόλουθους τρόπους.

7.1.1.1 Ορθές γεωπονικές πρακτικές

Η πρόληψη της μόλυνσης από τις αφλατοξίνες είναι δυνατό να επιτευχθεί με χρήση υγιών σπόρων, σωστή άρδευση, εναλλαγή των καλλιεργειών, συγκομιδή μετά την πλήρη ωρίμανση, αποξήρανση της συγκομιδής άμεσα και αποθήκευση υπό τις κατάλληλες ατμοσφαιρικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία), και λήψη μέτρων κατά των εντόμων στην καλλιέργεια. Αρχικά, κρίνεται απαραίτητο να τελείται κατάλληλος προγραμματισμός της φύτευσης, άρδευσης και συγκομιδής (Jones και συν., 1981). Το επίπεδο της πρωτογενούς πρόληψης είναι το πιο σημαντικό και αποτελεσματικό σχέδιο για τη μείωση της μυκητιακής ανάπτυξης και της παραγωγής μυκοτοξινών που επακολουθεί.

Ο Holbrook και οι συνεργάτες του (1994) ανέπτυξαν μια τεχνική μεγάλης κλίμακας στον τομέα του ελέγχου, για τον υπολογισμό της αντίστασης του εδάφους στη μόλυνση με αφλατοξίνες πριν από τη συγκομιδή στο φιστίκι. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην υπόγεια άρδευση σε ένα ερημικό περιβάλλον της ερήμου, με σκοπό τη διατήρηση μιας παρατεταμένης περιόδου ξηρασίας στην περιοχή του περικαρπίου, διατηρώντας παράλληλα το φυτό ζωντανό. Σε αρχικές δοκιμές που διεξήχθησαν σε ερημικό περιβάλλον χωρίς υπόγεια άρδευση, οι ποικιλίες φιστικιών ξεράθηκαν και οι σπόροι τους αφυδατώθηκαν σε σύντομο χρονικό διάστημα στο έδαφος, πριν από κάθε μόλυνση που θα μπορούσε να συμβεί. Η χρήση ενός μικρού ποσοστού υπόγειας άρδευσης, με σκοπό την παράταση της βιωσιμότητας των φυτών κατά τη διάρκεια της ξηρασίας, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της μόλυνσης.

Επίσης, ο Sanders και οι συνεργάτες του (1993) παρατήρησαν υψηλά επίπεδα μόλυνσης από αφλατοξίνες, σε ποικιλίες φιστικιών που εκτέθηκαν τεχνητά σε θερμότητα και ξηρασία, ενώ παράλληλα διατηρούσαν φυτά χωρίς καμία έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες, και στα οποία υπήρχε παροχή άρδευσης στο ριζικό σύστημα. Η

ανθεκτικότητα στην ξηρασία είναι ένα χαρακτηριστικό που μπορεί να χρησιμεύσει ως έμμεσο εργαλείο επιλογής για αντίσταση στη μόλυνση από αφλατοξίνες πριν από τη συγκομιδή. Ο Holbrook και οι συνεργάτες του (2000) αξιολόγησαν την αντίσταση στη μόλυνση με αφλατοξίνες πριν από τη συγκομιδή, σε ένα σύνολο γονότυπων με διαφορετικά επίπεδα ξηρασίας και ανθεκτικότητας (Rucker και συν., 1995), και συσχέτισαν θετικά τα χαρακτηριστικά της ανθεκτικότητας στην ξηρασία με τη μόλυνση από αφλατοξίνες.

7.1.1.2 Καλλιέργεια ανθεκτικών ποικιλιών

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν δημιουργηθεί ανθεκτικές ποικιλίες καλαμποκιού (Widstrom και συν., 1984) και φιστικιού (Mixon, 1981) έναντι του *A. flavus*. Η ανθεκτικότητα επιτυγχάνεται με την ταυτοποίηση ανθεκτικού γενετικού υλικού και την εισαγωγή του στις ποικιλίες των καλλιεργειών. Οι Lillehoj και Zuber (1975), σε διάφορες εργαστηριακές μελέτες και μελέτες στον αγρό, βρήκαν διαφορές σε ποικιλίες καλαμποκιού, όσον αφορά στην αντοχή στον *A. flavus* και στην παραγωγή αφλατοξίνης που ακολουθεί. Ωστόσο, η αντίσταση στην εισβολή των τοξινογόνων μυκήτων έχει αποδοθεί σε διάφορους βιοχημικούς, περιβαλλοντικούς και φυσικούς παράγοντες. Οι παράγοντες που δεν μπορούν να ελεγχθούν, είναι πιθανόν να οδηγήσουν σε αποτυχία αξιοποίησης των επιλεγμένων ανθεκτικών ποικιλιών.

7.1.1.3 Χρήση της γενετικής μηχανικής

Ο έλεγχος των αφλατοξινών είναι δυνατός, όταν τεθούν ως «στόχος» οι βιοχημικοί μηχανισμοί που διέπουν τη βιοσύνθεση των αφλατοξινών (Yu και συν., 2000b· Chang και συν., 2000). Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τον εντοπισμό των γονιδίων και των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των αφλατοξινών. Επίσης, με την εφαρμογή της γενετικής μηχανικής στο εμπορικό καλαμπόκι, στο βαμβάκι και στις ποικιλίες φιστικιών, μπορεί να επιτευχθεί η μεταφορά γονιδίων που κωδικοποιούν ανθεκτικούς παράγοντες οι οποίοι αναστέλλουν τη σύνθεση των τοξινών (Cary και συν., 2000). Πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι η γονιδιακή ρύθμιση των δευτερογενών μεταβολιτών των αφλατοξινών και των υπόλοιπων μυκήτων τελείται μέσω μεταγραφικών ρυθμιστικών στοιχείων. Ο προσδιορισμός των στοιχείων που ρυθμίζουν το δευτερογενή μεταβολισμό ενδεχομένως οδηγεί στον προσδιορισμό του μηχανισμού αύξησης της παραγωγής των ωφέλιμων μεταβολιτών και μείωσης της παραγωγής τοξικών μεταβολιτών, και επίσης συμβάλλει στην αναγνώριση των σιωπηλών φυσικών

προϊόντων, αλλά και στην ευρύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών με τους οποίους παράγονται οι δευτερογενείς μεταβολίτες. Η γενετική μηχανική έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ανθεκτικών ποικιλιών στην ανάπτυξη τοξινών. Η πρόληψη της μόλυνσης των τροφίμων με τους αφλατοξινογόνους μύκητες είναι η πιο κατάλληλη προσέγγιση για την αποφυγή των πιθανών κινδύνων. Ωστόσο, υπό ορισμένες συνθήκες, και με βάση τις μεθόδους αποθήκευσης που χρησιμοποιούνται, η πρόληψη δεν είναι πάντα εφικτή, ιδίως όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες δημιουργούν ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη των μυκήτων και την παραγωγή τοξινών.

7.1.1.3.α Διαγονιδιακές καλλιέργειες για την καταπολέμηση εντόμων

Το βακτήριο *Bacillus thuringiensis* (Bt) παράγει μια πρωτεΐνη η οποία είναι τοξική για ορισμένα έντομα. Το καλαμπόκι, το βαμβάκι, οι πατάτες, καθώς και άλλες καλλιέργειες, έχουν τροποποιηθεί γενετικά, και εκφράζουν τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη για τον έλεγχο των εντόμων. Από τα μέσα της δεκαετίας του 1990, στο εμπόριο διατίθενται διαγονιδιακές καλλιέργειες Bt. Το 2001, καλλιεργήθηκαν γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες σε 130 εκατομμύρια στρέμματα σε όλο τον κόσμο (EPA-Environmental Protection Agency, 2001). Ο πρωταρχικός στόχος του διαγονιδιακού αραβόσιτου Bt είναι το λεπιδόπτερο *Ostrinia nubilalis*. Το έντομο αυτό, όχι μόνο μειώνει την απόδοση του καλαμποκιού, αλλά συνδέεται επίσης με λοιμώξεις από το *Fusarium spp.* και τον *A. flavus* (Dowd και συν., 1998). Η καταστροφή του αραβόσιτου μπορεί να είναι εκτεταμένη και, κάτω από τις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα αφλατοξινών. Στις μεσοδυτικές χώρες, οι ποικιλίες καλαμποκιού Bt μείωσαν τη μόλυνση των καρπών με τον *A. flavus*, και το ποσοστό ανάπτυξης των προνυμφών, καθώς και τις συγκεντρώσεις των αφλατοξινών στα υβρίδια BT11 και MOB810 (Sims και συν., 1996).

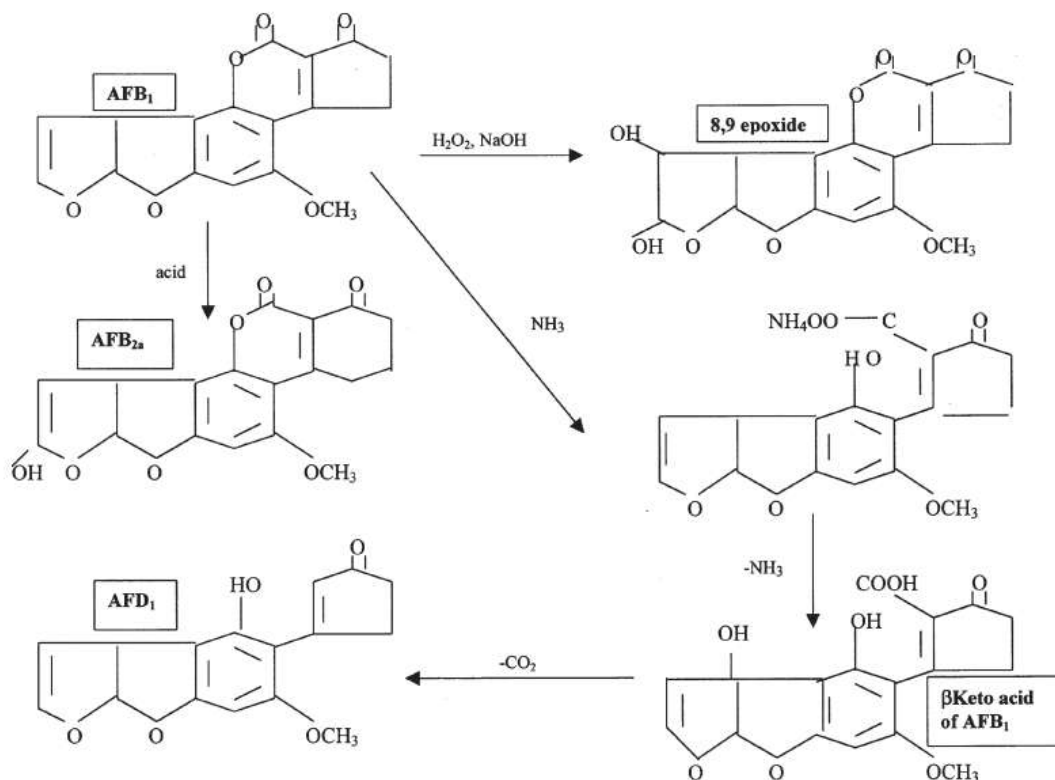
7.1.1.3.β Ενζυματική αποδόμηση των αφλατοξινών από βακτήρια

Ο Ciegler και οι συνεργάτες του (1966) έλεγξαν περίπου 1000 μικροοργανισμούς για την ικανότητα καταστροφής ή μετατροπής των AFB₁ και AFG₁. Μόνο ένα από τα βακτήρια που εξετάστηκαν, το *Flavobacterium aurantiacum* - NRRL B-184, απομάκρυνε πλήρως την αφλατοξίνη AFB₁. Η θερμοκρασία και το pH επηρεάζουν την απορρόφηση της τοξίνης από τα κύτταρα. Τα αδρανοποιημένα από τη θερμότητα κύτταρα μειώνουν τα επίπεδα της αφλατοξίνης (Line και Brackett, 1995). Τα μολυσμένα από αφλατοξίνες τρόφιμα, όπως το γάλα, το λάδι, το φιστικοβούτυρο, τα αράπικα

φιστίκια, και το καλαμπόκι, αποτοξινώθηκαν πλήρως παρουσία του βακτηρίου *F. aurantiacum* - NRRL B-184, και δεν σχηματίστηκαν νέες τοξικές ενώσεις. Οι Hao και Brackett (1988) υποστήριξαν την αποτελεσματικότητα αυτού του οργανισμού στην απομάκρυνση της AFB₁ από το γάλα αράπικου φιστικιού (peanut milk) που είχε εμβολιαστεί με *F. aurantiacum*. Πρόσφατες έρευνες σε αυτόν τον τομέα επικεντρώνονται στη μελέτη των πιθανών μηχανισμών αποδόμησης, είτε μέσω του βακτηρίου ή μέσω της προσρόφησης της τοξίνης στα κύτταρα.

Ο Line και οι συνεργάτες του (1994) σήμαναν την AFB₁ με ¹⁴C (ραδιενεργό ισότοπο του άνθρακα, με πυρήνα που περιέχει 6 πρωτόνια και 8 νετρόνια), η οποία στη συνέχεια εκτέθηκε στο *F. aurantiacum* για τον εντοπισμό και την ανίχνευση του ραδιοσημασμένου προϊόντος. Ο ρυθμός απομάκρυνσης της AFB₁ από τα ζωντανά κύτταρα ήταν πολύ υψηλότερος, σε σύγκριση με τα νεκρά κύτταρα, αλλά και οι δύο αυτοί τύποι κυττάρων απορρόφησαν ένα ποσοστό της AFB₁. Επίσης, η απελευθέρωση του σημασμένου CO₂ μόνο από τα ζωντανά κύτταρα δείχνει ότι κάποιο ποσό της AFB₁ μεταβολίζεται από τα φλαβοβακτήρια. Οι D'Souza και Brackett (1998) διερεύνησαν το ρόλο των μεταλλικών ιόντων (Cu²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ και Co²⁺), σε μια προσπάθεια να κατανοήσουν το ενζυμικό σύστημα που εμπλέκεται στην αποδόμηση της AFB₁ από το *F. aurantiacum*.

Η μελέτη της επίδρασης των μετάλλων έδειξε ότι τα ιόντα χαλκού και ψευδάργυρου αναστέλλουν την αποδόμηση της αφλατοξίνης. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν την επίδραση του ενζυμικού συστήματος στη διαδικασία αποδόμησης (D'Souza και Brackett, 2001). Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (800 γραμμάρια ολικής πρωτεΐνης / ml) από το *F. aurantiacum* αποδόμησαν 74,1% της τοξίνης σε υδατικό διάλυμα, ενώ αφαιρέθηκε μόνο το 5,5% της AFB₁ στις απενεργοποιημένες με θέρμανση πρωτεΐνες. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που επεξεργάστηκαν με DNase I (δεοξυριβονουκλεάση I) αποδόμησαν το 80,5% της AFB₁ σε διάλυμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η απομάκρυνση της αφλατοξίνης από το *F. aurantiacum* δεν οφείλεται σε μη ειδική δέσμευση με το DNA του βακτηρίου. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που επεξεργάστηκαν με την πρωτεϊνάση K αποδόμησαν το 34,5% της AFB₁ σε pH 7, γεγονός που δείχνει την πιθανή συμμετοχή του ενζύμου (Smiley και Draughon, 2000).



Εικόνα 7.1. Πιθανός μηχανισμός αποδόμησης της αφλατοξίνης B₁

7.1.1.3.γ Πρόσδεση των αφλατοξινών σε στελέχη προβιοτικών βακτηρίων

Ο Karunaratne (1990) έδειξε ότι ο *Lactobacillus acidophilus*, ο *L. bulgaricus*, και ο *L. Planatarum*, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρεμπόδιση ανάπτυξης μούχλας ή για την αποδόμηση της αφλατοξίνης. Η επίδραση της ικανότητας του στελέχους GG του *Lactobacillus rhamnosus* να προσκολλάται στην AFB₁, διερευνήθηκε από τους Kankaanpää και Tuomola (2000). Η αφαίρεση της AFB₁ από το στέλεχος μείωσε την ικανότητα προσκόλλησης από το 30 στο 5%. Συνάγεται επομένως το συμπέρασμα ότι οι αφλατοξίνες μπορεί να επηρεάσουν τις ιδιότητες προσκόλλησης των προβιοτικών βακτηρίων, και, στη συνέχεια, να μειωθεί η συσσώρευση της AFB₁ στο έντερο, μέσω αυξημένης συγκέντρωσης του συμπλόκου αφλατοξίνες-βακτήρια.

Ο El-Nezami και οι συνεργάτες του (2000) μελέτησαν την ικανότητα προσκόλλησης του στελέχους GG του *L. rhamnosus* και του *Propionibacterium freudenreichii ssp. shermani* JS με την αφλατοξίνη B₁, και την απομάκρυνσή της από το δωδεκαδάκτυλο ορνίθων. Τα σύμπλοκα της AFB₁ με τους γαλακτοβάκιλλους παρέμειναν σταθερά για 1 ώρα. Η ουρία σχετίζεται με υδροφοβική αλληλεπίδραση και τα άλατα NaCl και CaCl₂

αποδείχθηκε ότι σχετίζονται με την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση. Τέλος το pH σχετίζεται με την πρόσδεση μέσω δεσμών υδρογόνου.

7.1.1.3.δ Ανταγωνιστική δράση μυκήτων

Μέχρι σήμερα, η μεγαλύτερη επιτυχία στον τομέα του βιολογικού ελέγχου της μόλυνσης από αφλατοξίνες έχει επιτευχθεί μέσω ανταγωνιστικού αποκλεισμού, με την εφαρμογή μη-αφλατοξινογενών στελεχών του *Aspergillus flavus* και του *A. parasiticus* στο έδαφος της ανάπτυξης των καλλιεργειών.

Τα στελέχη που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες καταλαμβάνουν την ίδια θέση με τα φυσικά τοξινογόνα στελέχη, και ανταγωνίζονται τα υποστρώματα καλλιέργειας. Πριν από τη συγκομιδή, η μόλυνση από αφλατοξίνες συνδέεται στις περισσότερες καλλιέργειες με την ξηρασία ή την υψηλή θερμοκρασία, ή με τις ζημιές από τα έντομα που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της περιόδου ωρίμανσης των καλλιεργειών (Payne και συν., 1992). Για να είναι αποτελεσματικός ο ανταγωνιστικός αποκλεισμός, τα ανταγωνιστικά στελέχη πρέπει να βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα, όταν οι συνθήκες καθιστούν την καλλιέργεια ευπαθή στις μολύνσεις. Το ανταγωνιστικό στέλεχος που έχει εφαρμοστεί στο έδαφος, στη συνέχεια, εκτοπίζει τα στελέχη άγριου είδους κατά τη μόλυνση της καλλιέργειας. Δύο κύριοι παράγοντες, καθορίζουν την αποτελεσματικότητα της στρατηγικής αυτής. Πρώτον, τα στελέχη που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι πραγματικά ανταγωνιστικά και κυρίαρχα σε σχέση με τα τοξινογόνα στελέχη που είναι ήδη παρόντα. Δεύτερον, η τεχνική που χρησιμοποιείται για τη χρησιμοποίηση των ανταγωνιστικών στελεχών πρέπει να είναι αποτελεσματική στη μεταφορά της αναγκαίας ποσότητας των κονιδίων για την επίτευξη του ανταγωνιστικού πλεονεκτήματος. Επιπλέον, η επιλογή της χρονικής στιγμής της εφαρμογής είναι ζωτικής σημασίας για την εξασφάλιση του απαραίτητου ανταγωνιστικού επιπέδου, όταν η απειλή της μόλυνσης των καλλιεργειών είναι μεγαλύτερη. Οι μύκητες που χρησιμοποιούνται για τον ανταγωνιστικό αποκλεισμό θα πρέπει να είναι, τόσο μη τοξινογενείς, όσο και ανταγωνιστικοί. Τα είδη *Aspergillus* παράγουν, όχι μόνο τις αφλατοξίνες, αλλά επίσης μια ποικιλία από άλλες τοξίνες και πρόδρομες ενώσεις των αφλατοξινών, συμπεριλαμβανομένων του κυκλοπιαζονικού οξέος, της στεριγματοκυστίνης καθώς και τις βερσικολορίνες (Cole και συν., 1981). Σε περίπτωση που ένα στέλεχος μολύνει μια καλλιέργεια, οι μεταβολίτες που παράγονται από το εν λόγω στέλεχος θα μολύνουν τη συγκεκριμένη καλλιέργεια.

Ο Cotty (1990) διερεύνησε την ικανότητα επτά μη αφλατοξινογόνων στελεχών του *Aspergillus flavus*, για τη μείωση της μόλυνσης βαμβακόσπορου με αφλατοξίνες, έπειτα από συνεπώαση με τοξινογόνα στελέχη σε πειράματα θερμοκηπίου. Έξι από τα μη-αφλατοξινογόνα στελέχη μείωσαν σημαντικά την ποσότητα της αφλατοξίνης που παράγεται στο βαμβακόσπορο από το τοξινογόνο στέλεχος.

7.1.2 Παρεμβάσεις μετά τη συγκομιδή

Η αποθήκευση των τροφίμων και οι τεχνικές επεξεργασίας στις βιομηχανικές χώρες μπορούν να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη των μυκοτοξινών, αλλά η συσσώρευση των αφλατοξινών μετά τη συγκομιδή εξακολουθεί να αποτελεί απειλή στις λιγότερο αναπτυγμένες χώρες, ιδιαίτερα στις τροπικές περιοχές. Ως εκ τούτου, ο προσδιορισμός των βασικών σημείων ελέγχου κατά τη διάρκεια της συγκομιδής, της ξήρανσης και των σταδίων της αποθήκευσης στην παραγωγή σιτηρών είναι απαραίτητος, για την ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών πρόληψης μετά τη συγκομιδή (Magan και Aldred, 2007). Οι πιθανές στρατηγικές παρέμβασης περιλαμβάνουν την πρόωρη συγκομιδή, τη σωστή ξήρανση, τη διατήρηση της υγιεινής, την κατάλληλη αποθήκευση, και την αντιμετώπιση των εντόμων (Wagacha και Muthomi, 2008). Αυτό ισχύει όχι μόνο για τον αραβόσιτο, αλλά και για τους καρπούς με κέλυφος, όπως τα φιστίκια, όπου έχει σημειωθεί σημαντική μείωση των αφλατοξινών, λόγω βελτίωσης της ξήρανσης και των συνθηκών αποθήκευσης την τελευταία δεκαετία (Wu, 2008). Η αντιμετώπιση της μόλυνσης με αφλατοξίνες είναι εφικτή με τη διαλογή και την απομάκρυνση των μολυσμένων καρπών. Αυτό μπορεί να γίνει είτε με απλή φυσική διαλογή, είτε με τις μεθόδους διαχωρισμού πυκνότητας (Kabak και συν., 2006). Μετά τη διαλογή, υπάρχουν διάφορες μέθοδοι αναστολής της ανάπτυξης των *Aspergilli*, και ως εκ τούτου μείωσης της μόλυνσης με αφλατοξίνες μετά τη συγκομιδή. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν τον έλεγχο των επιπέδων υγρασίας σε αποθηκευμένα φυτά, της θερμοκρασίας, των παράσιτων, των εντόμων και των τρωκτικών (Kabak και συν., 2006). Οι συνδυασμοί αυτών των μεθόδων για τη μείωση των αφλατοξινών μετά τη συγκομιδή έχουν ελεγχθεί για την αποτελεσματικότητά τους σε πραγματικές συνθήκες υπαίθρου χώρου. Στις βιομηχανικές χώρες, η ξήρανση του αέρα και η συμπληρωματική θέρμανση χρησιμοποιούνται ευρέως για τον έλεγχο των επιπέδων της υγρασίας σε καλλιέργειες. Στη θερμοκρασία ξήρανσης 70° C, τα επίπεδα των αφλατοξινών στον αραβόσιτο είναι σημαντικά μειωμένα, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα στους 40°C. Ωστόσο, η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί δυνητικά να μειώσει τη φύτευση των

σπερμάτων, και να οδηγήσει σε αύξηση των ρωγμών του κελύφους (Hawkins και συν., 2005).

Επιπρόσθετα, οι χημικές μέθοδοι μπορούν να αποτοξινώσουν τις αφλατοξίνες με μείωση, καταστροφή ή αδρανοποίηση. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν την αμμωνίωση, την επεξεργασία με οξύ, καθώς και τη χρήση οξειδωτικών και αναγωγικών παραγόντων (Kabak και συν., 2006). Τα μειονεκτήματα των μεθόδων αυτών είναι:

- η μείωση της θρεπτικής αξίας και γευστικότητας
- ο έλεγχος παραμέτρων, όπως ο χρόνος αντίδρασης, η θερμοκρασία και η υγρασία
- οι χρονοβόρες και υψηλού κόστους πρόσθετες επεξεργασίες καθαρισμού
- η παραγωγή τοξικών παραπροϊόντων.

7.1.3 Προληπτικά μέτρα στους ζωικούς οργανισμούς

7.1.3.1 Παράγοντες παγίδευσης Novasil

Τα τελευταία χρόνια, το αργιλοπυριτικό νατριούχο ασβέστιο (NovaSil) διατίθεται στην αγορά ως αντισυσσωματοποιητικός παράγοντας των ζωοτροφών, και απορροφά τις αφλατοξίνες στο γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων, μειώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα και τις δυσμενείς επιπτώσεις αυτών των τοξινών (Phillips και συν., 2002). Μελέτες σε αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες της φυλής Sprague-Dawley, στους οποίους ακολουθήθηκε διατροφή με προσθήκη 2,0% (wt/wt) NovaSil για 28 εβδομάδες, δεν έδειξαν δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία. Μια αρχική μελέτη διερεύνησης της ανεκτικότητας και ασφάλειας του NovaSil στον άνθρωπο, οδήγησε στην καθιέρωση πρωτοκόλλων αναφοράς για τις μελέτες μακροχρόνιας αποτελεσματικότητας. Διεξάχθηκε μια τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή σε 50 εθελοντές, οι οποίοι χωρίστηκαν τυχαία σε 2 ομάδες: την ομάδα χαμηλής δόσης η οποία έλαβε 9 κάψουλες που περιείχαν 1,5 g NovaSil/ημέρα και την ομάδα υψηλής δόσης που έλαβε 9 κάψουλες που περιείχαν 3,0 g/ημέρα, για χρονικό διάστημα 2 εβδομάδων. Η συμμόρφωση ήταν εξαιρετική, και στο τέλος της μελέτης δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων για τις παρενέργειες ή για τις άλλες παραμέτρους της υγείας (Wang και συν., 2005). Συνεπώς, κατά τη διάρκεια της τρίμηνης μελέτης αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα του NovaSil στη μείωση των βιοδεικτών της έκθεσης στις αφλατοξίνες στο αίμα και σε δείγματα ούρων που συλλέχθηκαν από τα άτομα που συμμετείχαν. Τα επίπεδα των παραγώγων αφλατοξίνης - λευκωματίνης (αλβουμίνης), σε

δείγματα ορού που συλλέχθηκαν στην έναρξη της θεραπείας και στις 30 ημέρες, ήταν παρόμοια μεταξύ των ομάδων εικονικού φαρμάκου (placebo), της χαμηλής δόσης (1,5 g NovaSil / ημέρα), και της υψηλής δόσης (3,0 g NovaSil / ημέρα). Ωστόσο, τα επίπεδα των παραγώγων αφλατοξίνης - λευκωματίνης και στις δύο ομάδες παρέμβασης μειώθηκαν σημαντικά στους 3 μήνες, σε σύγκριση με τα επίπεδα της ομάδας του εικονικού φαρμάκου. Τα επίπεδα της αφλατοξίνης M_1 (AFM₁) σε δείγματα ούρων που συλλέχθηκαν στην έναρξη και μετά από 30 ημέρες δεν ήταν στατιστικά διαφορετικά μεταξύ των τριών ομάδων της μελέτης. Ωστόσο, στην ομάδα υψηλής δόσης βρέθηκε μία σημαντική μείωση των μέσων επιπέδων της AFM₁ σε δείγματα που συλλέχθηκαν στους 3 μήνες σε σύγκριση με τα επίπεδα της ομάδας του εικονικού φαρμάκου. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι κάψουλες που περιείχαν NovaSil μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μειώσουν τη βιοδιαθεσιμότητα των αφλατοξινών της διατροφής (Wang και συν., 2008).

7.1.3.2 Χλωροφυλλίνη

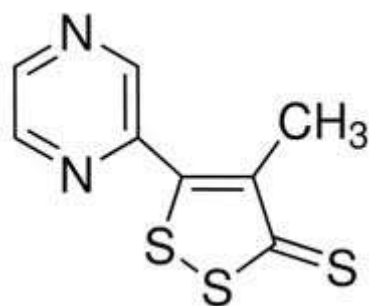
Σε ένα μεγάλο αριθμό ζωικών μοντέλων, έχουν προσδιοριστεί οι αντικαρκινικές ιδιότητες της χλωροφυλλίνης, ενός υδατοδιαλυτού παραγώγου της χλωροφύλλης, (Breinholt και συν., 1995a· Dashwood και συν., 1998). Ο αρχικός χαρακτηρισμός της χλωροφυλλίνης ως αντικαρκινογόνος παράγοντας προέκυψε από την αναστολή της ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος σε πέστροφες, των οποίων το σιτηρέσιο είχε επιμολυνθεί με αφλατοξίνες (Breinholt και συν., 1995a). Παρά το γεγονός ότι ο πρωταρχικός τρόπος δράσης θεωρείται ότι ήταν η δέσμευση της αφλατοξίνης από τη χλωροφυλλίνη σε αναλογία 1:1 (Breinholt και συν., 1995b), πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι στο μηχανισμό δράσης συμβάλλουν και ενζυματικές ιδιότητες (Fahey και συν., 2005). Σε μια πρόσφατη μελέτη, η χλωροφυλλίνη φαίνεται να είναι προστατευτική έναντι του καρκίνου που προκαλείται από αφλατοξίνες σε επίμυες (Simonich και συν., 2007). Σε μια τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο μελέτη, προσδιορίστηκε ο ρόλος της χλωροφυλλίνης στη μεταβολή της βιοδιαθεσιμότητας της αφλατοξίνης (Egner και συν., 2001). Σε 180 υγιείς ενήλικες χορηγήθηκαν διά του στόματος 100 mg χλωροφυλλίνης ή ένα εικονικό φάρμακο τρεις φορές την ημέρα πριν από κάθε γεύμα, για 4 μήνες. Το κύριο τελικό σημείο ήταν η διαμόρφωση των επιπέδων των παραγώγων αφλατοξίνης-N7-γουανίνης (αφλατοξίνη που αντιδρά με τη θέση N7 της γουανίνης) στο ουροποιητικό σύστημα. Η συμμόρφωση με το πρωτόκολλο της μελέτης ήταν εξαιρετική, και δεν αναφέρθηκαν ανεπιθύμητες

ενέργειες. Η αφλατοξίνη-N7-γουανίνη ανιχνεύθηκε σε 105 από τα 169 διαθέσιμα δείγματα. Η κατανάλωση χλωροφυλλίνης σε κάθε γεύμα οδήγησε σε συνολική μείωση 55% των μέσων επιπέδων στα ούρα αυτού του βιοδείκτη αφλατοξίνης, σε σύγκριση με τα άτομα που έλαβαν εικονικό φάρμακο.

Σε μια πρόσφατη μελέτη, ο Jubert και οι συνεργάτες του (2009) χρησιμοποίησαν φασματομετρία μάζας, για τη διερεύνηση της απορρόφησης και της φαρμακοκινητικής της AFB₁ και των μεταβολιτών της σε τέσσερις εθελοντές. Για τις ανάγκες της μελέτης χρησιμοποίησαν δόσεις ¹⁴C και AFB₁, στο επιτρεπτό εύρος ασφάλειας. Με βάση τα συνολικά ισοδύναμα του ¹⁴C, η AFB₁ απορροφήθηκε ταχέως στο πλάσμα σε όλους τους εθελοντές. Οι παρεμβάσεις με χλωροφυλλίνη ή με χλωροφύλλη οδηγούν σε μειωμένη πρόσληψη και κατανομή της AFB₁ μεταξύ όλων των ατόμων. Σε όλα τα άτομα, η χλωροφύλλη προκάλεσε σημαντική μείωση, της τάξεως του 40-60%, της απέκκρισης των ουροποιητικών ισοδυνάμων της αφλατοξίνης.

Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι η χλωροφυλλίνη (και η χλωροφύλλη) διαμεσολαβούν στη μείωση της συστηματικής απορρόφησης της αφλατοξίνης στον άνθρωπο. Έτσι, οι προφυλακτικές παρεμβάσεις με χλωροφυλλίνη, ή με ενίσχυση της διατροφής με τροφές πλούσιες σε χλωροφύλλη, μπορεί να αντιπροσωπεύουν τα πρακτικά μέσα για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος ή άλλων μορφών καρκίνου, που προκαλούνται από το περιβάλλον στο οποίο προσροφώνται καρκινογόνες ουσίες (π.χ., οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, οι ετεροκυκλικές αμίνες), οι οποίες αποτελούν σημαντικούς αιτιολογικούς παράγοντες.

7.1.3.3 Διθειολεθιόνες (ολτιπράζη)



Εικόνα 7.2. Δομή ολτιπράζης

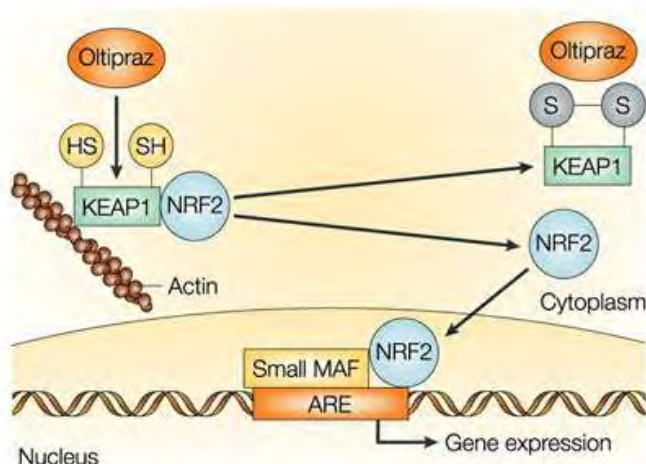
Η χημειοπροφύλαξη αποτελεί βασική στρατηγική για τη δευτερογενή πρόληψη του καρκίνου. Η προσέγγιση αυτή συνεπάγεται την προληπτική χρήση των φαρμάκων, συμπληρωμάτων διατροφής ή τροφίμων, τα οποία καθυστερούν, παρεμποδίζουν ή ακόμα και αναστρέφουν τη διαδικασία καρκινογένεσης. Οι στρατηγικές αυτές οδηγούν στη μεταβολή της μοίρας των κυττάρων, είτε παρεμποδίζοντας τις γενετικές βλάβες και τον πολλαπλασιασμό των προνεοπλασματικών κυττάρων ή, εναλλακτικά, επιταχύνοντας το θάνατο των κυττάρων με την απόπτωση. Μία επιτυχημένη στρατηγική για χημειοπροφύλαξη στον καρκίνο είναι η επαγωγή των ενζύμων που μεταβολίζουν τοξικές ουσίες, με αποτέλεσμα την εξάλειψη των ενδογενών και περιβαλλοντικών καρκινογόνων ουσιών.

Οι επαγωγείς των συζευκτικών ενζύμων, όπως οι διθειολεθιόνες και η σουλφοραφάνη, αναστέλλουν την ογκογένεση των περιβαλλοντικών καρκινογόνων ουσιών σε διάφορα ζωικά μοντέλα (Roebuck και συν, 1991· Zhang και συν., 1992). Διάφορες μελέτες αναφέρουν ότι βασικός μοριακός στόχος της ολτιπράζης και της σουλφοραφάνης αποτελεί το σύμπλοκο Kead1-NRF2. Ο μεταγραφικός παράγοντας NRF2 αλληλεπιδρά με το αντιοξειδωτικό στοιχείο απόκρισης (ARE) στην περιοχή του υποκινητή των αποτοξινωτικών ενζύμων. Η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που προσδένεται στην ακτίνη, Kead1, είναι ένας αναστολέας του NRF2, ο οποίος διευκολύνει την ουβικουιτίνωσή της και την αποικοδόμησή της, που ακολουθεί. Οι επαγωγείς ολτιπράζη και σουλφοραφάνη διακόπτουν αυτή τη διαδικασία, επιτρέποντας τη συσσώρευση του NRF2 και τη μετατόπισή του στον πυρήνα (Kensler και συν., 2007). Μελέτες έχουν δείξει ότι η καταστολή των γονιδίων NRF2 σε ποντίκια οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία στα καρκινογόνα και στην απώλεια της χημειοπροφυλακτικής αποτελεσματικότητας των επαγωγέων (ολτιπράζη, σουλφοραφάνη) (Fahey και συν, 2002· Ramos-Gomez και συν., 2001). Τα αποτελέσματα αυτά αποδίδουν την αντικαρκινική δράση των επαγωγέων στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NRF2.

Η ολτιπράζη (4-Methyl-5-(2-pyrazinyl)-1,2-dithiole-3-thione), μία υποκατεστημένη 1,2-διθειολ-3-θειόνη, αναπτύχθηκε αρχικά από τη φαρμακοβιομηχανία ως μια πιθανή θεραπεία για τη σχιστοσωμίαση - πρόκειται για παρασιτική ασθένεια - , και αξιολογήθηκε εκτενώς σε κλινικές δοκιμές στις αρχές του 1980. Οι κλινικές δοκιμές στο Μαλί, στη Γκαμπόν και στη Γαλλία, με συνολικές δόσεις από 1,25 - 7,5 g, σε χρονικό διάστημα 1-5 ημέρες, οδήγησαν σε ποσοστά ίασης της τάξεως του 90%. Ο Bueding και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η χορήγηση ολτιπράζης σε ποντίκια με σχιστοσωμίαση προκάλεσε δραματική μείωση στις αποθήκες της

γλουταθειόνης στα παράσιτα, και σημαντική αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης σε πολλούς ιστούς του ξενιστή (Bueding και συν., 1982). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η ολτιπράζη είναι ισχυρός επαγωγέας των ενζύμων που σχετίζονται με τη διατήρηση των αυξημένων επιπέδων γλουταθειόνης, καθώς και των ενζύμων (τρανσφεράση της γλουταθειόνης, ρεδοκτάση της γλουταθειόνης) που είναι απαραίτητα για την αποτοξίνωση των καρκινογόνων ουσιών στους ιστούς ποντικών και επίμυων (Ansher και συν., 1986).

Αυτά τα αποτελέσματα οδήγησαν τον Bueding και τους συνεργάτες του στο συμπέρασμα ότι η ολτιπράζη μπορεί να έχει χημειοπροφυλακτικές ιδιότητες στον καρκίνο.



Nature Reviews | Cancer

Εικόνα 7.3. Μοριακός μηχανισμός αλληλεπίδρασης της ολτιπράζης με το μεταγραφικό παράγοντα NRF2

Σε μία προκλινική μελέτη του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου, η ολτιπράζη βρέθηκε να είναι αποτελεσματική ως αντικαρκινογόνος ουσία σε διάφορα πειραματικά ζωικά μοντέλα (Kensler και συν., 1999). Οι βιοδείκτες των αφλατοξινών χρησιμοποιήθηκαν ως ενδιάμεσα τελικά σημεία σε μια μελέτη χημειοπροφύλαξης της ολτιπράζης στη Λαϊκή Δημοκρατία της Κίνας (Kensler και συν., 1998, Wang και συν., 1999).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, οι συμμετέχοντες έλαβαν εικονικό φάρμακο, ή 125 mg ολτιπράζη ημερησίως, ή 500 mg ολτιπράζη την εβδομάδα. Τα επίπεδα της αφλατοξίνης M₁ στα άτομα που έλαβαν 500 mg την εβδομάδα μειώθηκαν κατά 51% σε σύγκριση με

την ομάδα του εικονικού φαρμάκου. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα της αφλατοξίνης M₁ στην ομάδα που έλαβαν 125mg συγκριτικά με την ομάδα του εικονικού φαρμάκου. Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται στην αναστολή της ενεργότητας του κυτοχρώματος P450 1A2. Τα μέσα επίπεδα της αφλατοξίνης-μερκαπτουρικού οξέος (ένα παράγωγο συζευγμένο με γλουταθειόνη) ήταν αυξημένα κατά έξι φορές στην ομάδα των 125mg, αλλά παρέμειναν αμετάβλητα στην ομάδα των 500 mg. Τα αυξημένα επίπεδα αφλατοξίνης-μερκαπτουρικού οξέος αντικατοπτρίζουν την επαγωγή της σύζευξης της αφλατοξίνης μέσω της δράσης της γλουταθειόνης. Η προφανής έλλειψη της επαγωγής στην ομάδα των 500 mg πιθανώς προκαλείται από το μειωμένο σχηματισμό των αφλατοξινών-8-9-εποξειδίων για τη σύζευξη, μέσω αναστολής του CYP1A2 που παρατηρείται σε αυτή την ομάδα.

7.1.3.4 Σουλφοραφάνη

Αν και η κλινική δοκιμή της ολτιπράζης απέδειξε την επίδρασή της στις οδούς που οδηγούν στην αποτοξίνωση του οργανισμού από αφλατοξίνες, η πρακτική της προληπτικής χορήγησης φαρμάκων είναι περιορισμένη στον οικονομικά αναπτυσσόμενο κόσμο. Οι λόγοι αφορούν στις πιθανές παρενέργειες που μπορούν να προκληθούν από τη μακροχρόνια έκθεση σε ένα φάρμακο, αλλά και το κόστος της θεραπείας, το οποίο μπορεί να την καταστήσει απαγορευτική για ένα μεγάλο ποσοστό πληθυσμού.

Η ολτιπράζη δεν είναι ο μόνος παράγοντας που επηρεάζει τις μεταβολές των ενζύμων μέσω της οδού NRF2-Kear1. Πολλά τρόφιμα έχουν υψηλά επίπεδα αυτών των επαγωγέων των ενζύμων (Fahey and Kensler, 2007). Η σουλφοραφάνη έχει εξεταστεί εκτενώς για τις χημειοπροφυλακτικές της ιδιότητες, και είναι ισχυρός ενεργοποιητής της οδού NRF2-Kear1, που οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των ενζύμων αποτοξίνωσης καρκινογόνων ουσιών (Dinkova-Kostova και συν., 2007· Fahey και συν., 2002). Πρόσφατα, ένα αφέψημα που σχηματίζεται από εγχύσεις ζεστού νερού σε λαχανάκια Βρυξελλών, τα οποία περιέχουν καθορισμένες συγκεντρώσεις γλυκοζινόλης, πρόδρομης ένωσης της αντικαρκινογόνου σουλφοραφάνης, αξιολογήθηκε για την ικανότητά του να μεταβάλλει τη διάταξη των αφλατοξινών.

Σε 200 υγιείς ενήλικες χορηγήθηκαν πόσιμα διαλύματα που περιείχαν, είτε 400, είτε λιγότερο από 3 μ moles γλυκοραφανίνης, το βράδυ, για 2 εβδομάδες (Kensler και συν., 2005). Τα επίπεδα της αφλατοξίνης-N7-γουανίνης ήταν παρόμοια μεταξύ των δύο ομάδων. Ωστόσο, η μέτρηση των επιπέδων των διθειοκαρβαμιδικών ενώσεων

(μεταβολίτες της σουλφοραφάνης) έδειξε εντυπωσιακές ατομικές διαφορές στη βιοδιαθεσιμότητα. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να αντικατοπτρίζει τις ατομικές διαφορές στο ποσοστό της υδρόλυσης της γλυκοραφανίνης σε σουλφοραφάνη από την εντερική χλωρίδα των συμμετεχόντων στη μελέτη. Σε άτομα που τρέφονταν με μπρόκολο το οποίο περιείχε γλυκοζινόλες, πρόδρομες ενώσεις της σουλφοραφάνης, παρατηρήθηκε μια σημαντική αντίστροφη συσχέτιση στην απέκκριση των διθειοκαρβαμιδικών (μεταβολίτες της σουλφοραφάνης) και των παραγώγων της αφλατοξίνης-N7-γουανίνης (Kensler και συν., 2005).

7.1.3.5 Πολυφαινόλες

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού (GTPs) αναστέλλουν διάφορες μορφές καρκίνου που προκαλούνται χημικά σε πειραματόζωα (Yang και συν., 2006). Ο Qin και οι συνεργάτες του (1997) μελέτησαν την επίδραση των GTPs στην ανάπτυξη της ηπατοκαρκινογένεσης που προκαλείται από την AFB₁ σε επίμυες. Τα δεδομένα από την έρευνα αυτή αποκάλυψαν ότι σε ζώα που τους είχε χορηγηθεί πράσινο τσάι η δέσμευση των αφλατοξινών στο DNA του ήπατος παρεμποδίστηκε κατά 20-30%, και οι προνεοπλασματικές αλλοιώσεις αναστάλθηκαν σημαντικά σε ποσοστό 60-70%.

Σε μια προκαταρκτική κλινική μελέτη σε ομάδα ατόμων υψηλού κινδύνου στην έκθεση στις αφλατοξίνες, οι επιδράσεις των GTPs αξιολογήθηκαν σε δείγματα ούρων που συλλέχθηκαν από μία τυχαιοποιημένη, μελέτη χημειοπροφύλαξης (Luo και συν., 2006). Όλοι οι συμμετέχοντες ήταν θετικοί για τα παράγωγα αφλατοξίνης – λευκωματίνης, και έλαβαν κάψουλες GTP ημερησίως σε δόσεις των 500, 1000 mg, ή έλαβαν εικονικό φάρμακο για 3 μήνες. Οι αναλύσεις έγιναν σε δείγματα αίματος και ούρων που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια αυτής της κλινικής μελέτης (Tang και συν., 2008).

Αρχικά τα επίπεδα των παραγώγων λευκωματίνης ήταν συγκρίσιμα για όλες τις ομάδες, και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των παραγώγων στην ομάδα του εικονικού φαρμάκου κατά τη διάρκεια των 3 μηνών. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της λευκωματίνης και στις δύο ομάδες που έλαβαν GTPs, μετά την πάροδο 3 μηνών.

Παρατηρήθηκε μείωση των μέσων επιπέδων της αφλατοξίνης M₁, σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο και στις δύο ομάδες που έλαβαν GTPs στους 3 μήνες της χορήγησης, ενώ παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του μέσου επιπέδου του μερκαπτουρικού οξέος της αφλατοξίνης και στις δύο ομάδες, σε σύγκριση με την ομάδα του εικονικού

φαρμάκου. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού GTPs διαμορφώνουν αποτελεσματικά τον μεταβολισμό και τη μεταβολική ενεργοποίηση των αφλατοξινών, όπως είχε παρατηρηθεί προηγουμένως με την ολτιπράζη (Wang και συν., 1999).

7.2 Εξυγίανση τροφίμων

Ο καλύτερος τρόπος για τον έλεγχο της μόλυνσης από αφλατοξίνες είναι η πρόληψη. Ωστόσο, όταν η μόλυνση έχει ήδη συμβεί, πρέπει να εφαρμοστούν εναλλακτικά μέτρα, για να μειωθούν οι κίνδυνοι έκθεσης. Μερικές από τις τρέχουσες πρακτικές αποτοξίνωσης μολυσμένων με αφλατοξίνη προϊόντων περιλαμβάνουν φυσικές, βιολογικές, και χημικές μεθόδους.

Οι αφλατοξίνες, όπως άλλωστε όλες οι μυκοτοξίνες, είναι σταθερές ενώσεις. Οπότε, τα περισσότερα από τα στάδια επεξεργασίας κατά την παραγωγή τροφίμων, όπως είναι οι θερμοκρασίες κάτω από 250° C, έχουν μικρή ή και καθόλου επίδραση στη δομή τους· κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε μολυσμένα προϊόντα. Ωστόσο, υπάρχουν άλλα "βήματα" επεξεργασίας, όπως το αλκαλικό μαγείρεμα (τρόπος μαγειρέματος που διατηρεί το αλκαλικό περιεχόμενο των τροφίμων, όπως είναι το μαγείρεμα στον ατμό), το μαγείρεμα σε αλκαλικό διάλυμα (διαδικασία για την προετοιμασία του αραβοσίτου, καθώς και άλλων δημητριακών, κατά την οποία το προϊόν εμποτίζεται και μαγειρεύεται σε ένα αλκαλικό διάλυμα, συνήθως ασβεστόνερο), που ακολουθείται στην παρασκευή των παραδοσιακών μεξικάνικων tortillas, η εξώθηση, το ψήσιμο, η νιφαδοποίηση (νιφάδες καλαμποκιού – corn flakes), και οι τροποποιημένες μέθοδοι επεξεργασίας, που μπορεί να μειώσουν την περιεκτικότητα σε αφλατοξίνες, αλλά όχι και να τη μηδενίσουν (Arzandeh και Jinap, 2011· Bullerman και Bianchini, 2007). Μερικές αναφορές κάνουν λόγο για ολοκληρωτική καταστροφή, σε συγκέντρωση 1600 µg/kg αφλατοξίνης στο καλαμπόκι, με τη διεργασία του τηγανίσματος (Magan, 2004).

Η χρήση ενός ενζύμου υποβάθμισης αφλατοξινών, που καλείται MADE (Myxobacteria Aflatoxin Degradation Enzyme), και λαμβάνεται από το εξω-κυτταρικό ένζυμο του *Myxococcus fulvus*, προτάθηκε ως αποτελεσματική, έχοντας μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος, ανοχή στο pH, και λογικό κόστος (Ji και συν., 2011). Η χρήση διαφορετικών μικροοργανισμών για την υποβάθμιση των αφλατοξινών ξεκίνησε στα 1960, με μια θετικής έκβασης επίδειξη απομάκρυνσης αφλατοξινών από το *Flavobacterium aurantiacum*, στο γάλα, το φυτικό λάδι, το καλαμπόκι, το αράπικο φιστίκι, το φιστικοβούτυρο, και το φιστικόγάλα (μη γαλακτοκομικό προϊόν, με κύρια συστατικά τα

φιστίκια και το νερό). Αποδείχτηκε ότι το pH και η θερμοκρασία επηρέαζαν την πρόσληψη αφλατοξίνης B₁ από τα κύτταρα. Ωστόσο, ο έντονος πορτοκαλί χρωματισμός, που προκαλείται από τη δράση του συγκεκριμένου βακτηρίου, περιορίζει την εφαρμογή του στη βιομηχανία τροφίμων (Smiley και Draughon, 2000). Παρόμοιες ιδιότητες έχουν και άλλοι μικροοργανισμοί, όπως εκείνοι του είδους *Rhodococci*, ο *Lactobacillus rhamnosus*, και ο *Enterococcus faecium* (Markov και συν., 2010). Ο *Myxococcus fulvus*, με υψηλή δραστηριότητα, και μεγάλο εύρος θερμοκρασίας και pH, έδειξε επιτυχημένη δράση, τόσο κατά της αφλατοξίνης B₁, όσο και κατά των αφλατοξινών G₁ και M₁ (Ji και συν., 2011).

Οι Zorlugenc και συν. (2008) εκτίμησαν την αποτελεσματικότητα της χρήσης όζοντος και οξονισμένου νερού, για την καταστροφή της αφλατοξίνης B₁ σε αποξηραμένα σύκα. Η "θεραπεία" τεχνητά μολυσμένων με αφλατοξίνες αποξηραμένων σύκων, έδειξε υψηλότερη υποβάθμιση της αφλατοξίνης B₁, καθώς η χρονική διάρκεια οξονισμού αυξάνεται, με το αέριο όζον να υπερέχει του οξονισμένου νερού. Πράγματι, στα πλαίσια της έρευνας, το αέριο όζον χρησιμοποιήθηκε αποτελεσματικά κατά της αφλατοξίνης B₁, σε συγκέντρωση 13,8 mg/L (Zorlugenc και συν., 2008). Ακόμα, το ψήσιμο πράσινων κόκκων καφέ στους 200° C για 12 λεπτά, οδήγησε σε μείωση κατά 79% των αφλατοξινών, η οποία αυξήθηκε στο 94%, καθώς ο χρόνος έκθεσης επεκτάθηκε στα 15 λεπτά (Magan, 2004). Σε άλλη μελέτη, βρέθηκε -επίσης- ότι η μείωση των αφλατοξινών στους κόκκους καφέ κατά το ψήσιμο εξαρτάται από τον τύπο και τη θερμοκρασία ψήσιματος, με μέτρια ποσοστά μείωσης αφλατοξινών· 42 με 56% (Bullerman και Bianchini, 2007).

Επιπρόσθετα, η ακτινοβολία γάμμα έχει αναφερθεί ότι μειώνει τα επίπεδα των συνολικών αφλατοξινών και της αφλατοξίνης B₁ σταδιακά, με αύξηση της δόσης της ακτινοβολίας από το 0 στα 10 kGy (kilogray) (Ghanem και συν., 2008· Kumar και συν., 2009). Εξάλλου, σε άλλη έρευνα, που διενεργήθηκε σε δείγματα μαύρου πιπεριού, παρατηρήθηκε μείωση της μόλυνσης με αφλατοξίνες, κατά 24-43%, χρησιμοποιώντας γάμμα ακτινοβολία, στους 60 kGy (Jalili και συν., 2010).

Η αποτοξίνωση από αφλατοξίνες σε τρόφιμα και ζωοτροφές είναι σημαντική ως βραχυπρόθεσμη μετασυλλεκτική λύση στο πρόβλημα. Αν και υπάρχουν πολλές χημικές μέθοδοι, η κατεργασία με αμμώνιο εξακολουθεί να είναι η μέθοδος που έχει εγκριθεί και η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την εξυγίανση. Σίγουρα, είναι σημαντικό κάθε φορά να προσδιορίζεται αν η χημική αποτοξίνωση αλλάζει τα διατροφικά χαρακτηριστικά των προϊόντων.

Τα γενετικά τροποποιημένα φυτά θα μπορούσαν να έχουν δυνατότητες υποβάθμισης των αφλατοξινών, καθώς και άλλες εφαρμογές (Davison, 2010· Montes και συν., 2009), ενώ υδατικά και οργανικά εκχυλίσματα φυτών, όπως το νεκρολούλουδο (*Tagetes minuta*), η *Lippia javanica*, ο ακανθώδης αμάραντος (*Amaranthus spinosus*), και το μακρύ πράσινο φασόλι (*Vigna unguiculata*), έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία κατά των *Aspergillus flavus* και *A. parasiticus* (Katerere και συν., 2010).

7.2.1 Εξυγίανση σιτηρών

Οι Fandohan και συν. (2005) μελέτησαν την τύχη των αφλατοξινών κατά την παραδοσιακή επεξεργασία φυσικά μολυσμένων τροφίμων με βασικό συστατικό το καλαμπόκι, στη δυτική Αφρική. Τα επίπεδα των αφλατοξινών μειώθηκαν κατά 7%, 8% και 60%, κατά την παρασκευή makume, akassa και owo, αντίστοιχα. Οι διεργασίες που είχαν ως αποτέλεσμα την αξιοσημείωτη μείωση των αφλατοξινών, συμπεριέλαβαν διαλογή, λίκνισμα (τεχνική διαχωρισμού του φλοιού από τον καρπό, με πέταγμα του μίγματος στον αέρα έτσι, ώστε να παρασυρθούν οι ελαφρύτεροι φλοιοί και να πέσουν στο έδαφος οι καρποί), πλύσιμο, και σύνθλιψη, σε συνδυασμό με αποφλοιώση των καρπών του καλαμποκιού. Η σταθερότητα των αφλατοξινών επηρεάστηκε περισσότερο σε συνθήκες αλκαλικές, που οδήγησαν σε μερική υποβάθμιση στα σιτηρά, κάτω από διεργασία βασισμένη στη θερμότητα.

Διάφορες έρευνες έδειξαν ότι η ζύμωση θα μπορούσε να καταστρέψει σχεδόν τη μισή αφλατοξίνη B₁ και G₁ σε ζύμη σιταριού. Οι περισσότερες αφλατοξίνες παραμένουν άθικτες κατά το ψήσιμο του άρτου, που έχει παρασκευαστεί με μολυσμένο αλεύρι σίτου ή καλαμποκιού. Έτσι, η καταστροφή τους κυμαίνεται από μηδενική, μέχρι τη μέγιστη απώλεια του ενός τετάρτου (Cheng και συν., 2010· Magan, 2004). Η μείωση της περιεκτικότητας σε αφλατοξίνη B₁ στο σιτάρι, με διάφορες μεθόδους μαγειρέματος, όπως το πλύσιμο, η θέρμανση, και το άχνισμα (ατμός), ερευνήθηκαν από τους Hwang and Lee (2006). Παρόλο που η μείωση στη συγκεκριμένη μυκοτοξίνη, ήταν ανάλογη με τη χρονική διάρκεια πλυσίματος (Jalili και συν., 2011), το πιο αποτελεσματικό στοιχείο ήταν η θερμοκρασία, ανεξάρτητα από την προέλευση του σιταριού (Hwang and Lee, 2006). Ακόμα, η θέρμανση μολυσμένων καρπών καλαμποκιού στους 160-180° C, κατέληξε σε μείωση της αφλατοξίνης B₁, από 383 στα 60 μg/kg (Magan, 2004).

Το επίπεδο της AFB₁, σε ρύζι που μαγειρεύτηκε με τρόπο συνηθισμένο, αλλά και υπό πίεση, μειώθηκε κατά 34% και 78-88%, αντίστοιχα (Bullerman και Bianchini, 2007). Οι διεργασίες που χρησιμοποιούν ατμό και νερό, όπως ο βρασμός, μπορούν να επηρεάσουν

τη συγκέντρωση των σιτηρών σε αφλατοξίνες, με υποβάθμισή τους, ή εξαγωγή στο υγρό μέρος του μαγειρέματος. Αντίθετα, οι αφλατοξίνες είναι σχετικά σταθερές κάτω από ξηρές συνθήκες, κάτι που επηρεάζεται σε διάφορους βαθμούς από την παρουσία υγρασίας. Η μείωση της συγκέντρωσης των αφλατοξινών στο μαγειρεμένο ρύζι, κυμαίνεται μεταξύ 6-88%, εξαρτώμενη από την αναλογία νερού προς ρύζι ή τις συνθήκες μαγειρέματος. Παρόμοιο εύρος μείωσης αφλατοξινών, έχει αναφερθεί για τα ζυμαρικά, το βρασμένο φαγόπυρο (πρόκειται για είδος σίκαλης), καθώς και το καλαμποκάλευρο και το χονδράλευρο καλαμποκιού. Ωστόσο, καμία ουσιαστική μόλυνση με αφλατοξίνες δεν αναφέρθηκε, κατά την παρασκευή -με βράσιμο- ενός βασικού φαγητού πρώτης ανάγκης, σε χώρες όπως η Ζάμπια και το Μαλάουι, που έχει ως πρώτη ύλη το καλαμπόκι (*nshima*). Αυτό πρέπει να οφείλεται στην παρουσία και άλλων συστατικών στη διαδικασία μαγειρέματος (Magan, 2004).

Διαφορετικές στρατηγικές έχουν εφαρμοστεί για την εξάλειψη ή την αδρανοποίηση των αφλατοξινών. Ωστόσο, τα προβλήματα ακόμα παραμένουν, όσον αφορά στην αποτελεσματικότητα, στην ασφάλεια, και στο οικονομικό κόστος των μεθόδων αυτών (Ji και συν., 2011). Η διεργασία της ζύμωσης είναι ένα πολύ σημαντικό "βήμα" στη μείωση και τον έλεγχο των αφλατοξινών κατά την αποθήκευση και την ενσίρωση (Uegaki και συν., 2010).

Η παραγωγή των παραδοσιακών μεξικάνικων tortillas, με αλκαλικό μαγείρεμα και διαβροχή του καλαμποκιού, είχε επίσης ως αποτέλεσμα τη μείωση της περιεκτικότητας σε αφλατοξίνες, που κυμάνθηκε από 52% έως και 84% (Bullerman και Bianchini, 2007). Άλλη μέθοδος παραγωγής tortillas, που περιελάμβανε τη χρήση υδροξειδίου του ασβεστίου, έδειξε μόνο περιορισμένη επίδραση στη συγκέντρωση των μυκοτοξινών αυτών (Magan, 2004). Γενικά, σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν οι Elias-Orozco και συν. (2002), ενώ χρησιμοποιούσαν την τεχνική της εξώθησης για την παραγωγή tortillas καλαμποκιού. Βρήκαν ότι η χρήση 0,3% λάιμ και 1,5% υπεροξειδίου του υδρογόνου, ήταν η πιο αποτελεσματική διαδικασία μείωσης. Οι όξινες συνθήκες, όπως αυτές που δημιουργούνται από τη χρήση ένυδρου κιτρικού οξέος, έχει αναφερθεί ότι αδρανοποιούν τις αφλατοξίνες, τόσο *in vitro*, όσο και στο καλαμπόκι, σχεδόν κατά 100% (Mendez-Albores και συν., 2005· 2007).

7.2.2 Εξυγίανση ξηρών καρπών

Πρόσφατα έχει διερευνηθεί και η επίδραση του ψησίματος στην περιεκτικότητα σε αφλατοξίνες των φιστικιών Αιγίνης (Yazdanpanah και συν., 2005). Παρ' όλο που όλα τα

πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν έδειξαν κάποιο βαθμό υποβάθμισης των αφλατοξινών (σε ποσοστά μεταξύ 17% και 63%), το ψήσιμο των δειγμάτων στους 120° C για 120 λεπτά, και στους 150° C για 30-120 λεπτά, είχε ως αποτέλεσμα την ουσιαστική μείωσή τους. Έτσι, ψήσιμο στους 150° C για 120 λεπτά, κατέστρεψε περισσότερο από το 95% της αφλατοξίνης B₁ στα φιστίκια Αιγίνης (Yazdanpanah και συν., 2005).

Η έκθεση στα μικροκύματα (500MHz-10GHz) μπορεί επίσης να οδηγήσει στην καταστροφή των αφλατοξινών. Τόσο η ισχύς των μικροκυμάτων, όσο και η χρονική διάρκεια έκθεσης, διαδραματίζουν κύριο ρόλο στην έκταση της καταστροφής. Αναφορές υπέδειξαν ότι μόνο 16 λεπτά έκθεσης μολυσμένων αράπικων φιστικιών σε επίπεδο 1,6 kW, είχαν ως αποτέλεσμα την καταστροφή σχεδόν του 95% της αφλατοξίνης B₁ που περιείχαν. Παρόμοια αποτελέσματα έδωσε η μικρότερη διάρκεια έκθεσης σε υψηλότερο επίπεδο ισχύος (5 λεπτά σε ισχύ 3,2 kW) (Magan, 2004).

Η παρουσία άλλων ουσιών, ειδικά αλκαλικών, μπορεί επίσης να οδηγήσει σε καταστροφή αφλατοξινών. Σε μελέτη του ο Hameed (1993) έδειξε ότι η προσθήκη αμμωνίας, είτε ως υδροξείδιο του αμμωνίου (0,7 και 1,0%), είτε ως διττανθρακικό αμμώνιο (0,4%), αυξάνει την καταστροφή, από 50-80% σε 95%.

Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και στην επεξεργασία με την τεχνική της εξώθησης (θέρμανση υπό υψηλή πίεση και διήθηση μέσω πόρων), του υποπροϊόντος που προκύπτει από την πίεση των αράπικων φιστικιών για την παραγωγή αραχιδέλαιου, και χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή. Η παρουσία υδροξειδίου του αμμωνίου αύξησε την καταστροφή από 23-66% σε 87% (Bullerman και Bianchini, 2007).

Επίσης, έχει αξιολογηθεί η αποδοτικότητα του όζοντος στην υποβάθμιση των αφλατοξινών στην ψίχα και στα αλεσμένα φιστίκια Αιγίνης. Έτσι, έγινε γνωστό ότι, όσο αυξάνεται ο χρόνος έκθεσης και η συγκέντρωση του όζοντος, τόσο αυξάνεται και η υποβάθμιση των αφλατοξινών. Όταν η ψίχα των φιστικιών αυτών εκτέθηκε σε συγκέντρωση όζοντος 9,0 mg/L για 420 λεπτά, το επίπεδο της αφλατοξίνης B₁, καθώς και των συνολικών αφλατοξινών μειώθηκε κατά 23 και 24%, αντίστοιχα. Αντίθετα, στα αλεσμένα φιστίκια Αιγίνης, κάτω από τις ίδιες συνθήκες, παρατηρήθηκε μείωση μόνο κατά 5% (Akbas και Ozdemir, 2006). Η αποδοτικότητα του οζονισμού και της ήπιας θέρμανσης στην υποβάθμιση των αφλατοξινών στην ψίχα των αράπικων φιστικιών και στο αλεύρι που παρασκευάζεται από αυτά, –επίσης, έχει– αξιολογηθεί. Η υποβάθμιση εκτιμήθηκε σε δείγματα φιστικιών που υποβλήθηκαν σε αέριο οζονισμό, κάτω από διάφορες θερμοκρασίες (25, 50, 75° C) και χρόνους έκθεσης (5, 10, 15 λεπτά). Οι υψηλότερες θερμοκρασίες και οι μεγαλύτεροι χρόνοι έκθεσης έδειξαν συνεργική δράση

με τη επίδραση του οζονισμού στη μείωση των αφλατοξινών. Μεταξύ όλων των αφλατοξινών, οι B₁ και G₁ εμφάνισαν τα υψηλότερα επίπεδα μείωσης. Ειδικότερα, καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν στην ψίχα, σε σχέση με το αλεύρι. Σαν συμπέρασμα, ο οζονισμός, σε θερμοκρασία δωματίου, για 10-15 λεπτά, είναι αποδοτικός και, παράλληλα, οικονομικός (Proctor και συν., 2004).

7.3 Ανάλυση επικινδυνότητας

Η εκτίμηση του κινδύνου είναι η εκτίμηση του μεγέθους και της πιθανότητας των κινδύνων στην υγεία του πληθυσμού που σχετίζονται με την έκθεση. Στο πλαίσιο της ασφάλειας των τροφίμων, ο κίνδυνος ορίζεται ως η εκτίμηση της πιθανότητας εμφάνισης παρενεργειών στην υγεία του ανθρώπου, οι οποίες σταθμίζονται για τη βαρύτητα τους που μπορεί να προκύψουν από την έκθεση σε βιολογικούς, χημικούς ή φυσικούς παράγοντες στα τρόφιμα. Η σημασία της εκτίμησης του κινδύνου δεν έγκειται μόνο στην εκτίμηση των κινδύνων για την ανθρώπινη υγεία, αλλά και στην λειτουργία του ως ένα πλαίσιο για την οργάνωση δεδομένων, καθώς και για την ανάθεση αρμοδιότητας για την ανάλυση (WHO, 2000).

Η ανάλυση κινδύνου ως επιστημονικό εργαλείο το οποίο εφαρμόζεται για την ασφάλεια των τροφίμων αποτελείται από τρία ξεχωριστά μέρη: την αξιολόγηση του κινδύνου, τη διαχείριση του κινδύνου και τέλος την επικοινωνία (NAS, 1983· FAO / WHO, 1995· 2002). Αυτά τα τρία στοιχεία είναι αλληλένδετα. Η ανάλυση του κινδύνου αποτελεί τη βάση της πολιτικής για την ασφάλεια των τροφίμων και των μέτρων προστασίας των καταναλωτών (FAO / WHO, 2002):

(Α) Αξιολόγηση του κινδύνου: Μια διαδικασία συστηματικής και αντικειμενικής αξιολόγησης όλων των πληροφοριών, σχετικά με τους κινδύνους των τροφίμων (αποτελείται από τον προσδιορισμό των κινδύνων, τον χαρακτηρισμό του κινδύνου, και την αξιολόγηση της έκθεσης).

(Β) Διαχείριση του κινδύνου: Η διαδικασία της στάθμισης εναλλακτικών πολιτικών με βάση την εκτίμηση του κινδύνου και, εάν απαιτείται, την επιλογή και εφαρμογή κατάλληλων εναλλακτικών δυνατοτήτων ελέγχου και κανονιστικών μέτρων.

(Γ) Η κοινοποίηση των κινδύνων: Η ανταλλαγή πληροφοριών και απόψεων σχετικά με τον κίνδυνο και τις επιλογές διαχείρισης του κινδύνου μεταξύ των αξιολογητών του κινδύνου, των διαχειριστών του κινδύνου και των καταναλωτών.

7.3.1 Αξιολόγηση του κινδύνου

Η επιστημονική διαδικασία της αξιολόγησης του κινδύνου διαμορφώθηκε από την αμερικανική Εθνική Ακαδημία Επιστημών, το 1983. Η εκτίμηση του κινδύνου περιλαμβάνει τα αλληλένδετα βήματα αναγνώρισης της επικινδυνότητας και της κατανόησης του κινδύνου που αντιπροσωπεύει (ταυτοποίηση κινδύνου).

1. Ποιοτική ή / και ποσοτική αξιολόγηση των αρνητικών επιπτώσεων του κινδύνου για την ανθρώπινη υγεία (χαρακτηρισμός κινδύνου).
2. Ποιοτική ή / και ποσοτική αξιολόγηση του βαθμού κατανάλωσης ή πρόσληψης του επικίνδυνου παράγοντα (αξιολόγηση της έκθεσης).
3. Χαρακτηρισμός του κινδύνου.

7.3.2 Προσδιορισμός του κινδύνου

Ο προσδιορισμός του κινδύνου είναι η διαδικασία καθορισμού για το αν η έκθεση σε έναν παράγοντα μπορεί να οδηγήσει σε δυσμενή αποτελέσματα για την υγεία. Βασίζεται στην ανάλυση δεδομένων τα οποία περιλαμβάνουν παρατηρήσεις δεδομένων στον άνθρωπο και τα ζώα, και ανάλυση των μηχανισμών δράσης. Κάθε πηγή πληροφόρησης έχει τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς που καθορίζουν τη σημαντικότητα των αποδεικτικών στοιχείων. Το αποτέλεσμα του προσδιορισμού των κινδύνων είναι μια επιστημονική κρίση ως προς το εάν η χημική ουσία που αξιολογείται, υπό δεδομένες συνθήκες έκθεσης, μπορεί να προκαλέσει αρνητικές συνέπειες στην υγεία του ανθρώπου (WHO, 1999, 2006).

7.3.3 Αξιολόγηση της έκθεσης

Η αξιολόγηση της έκθεσης περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της έκθεσης στους ανθρώπινους πληθυσμούς (WHO, 1993). Ο κίνδυνος από μυκοτοξίνες εξαρτάται από το βαθμό της έκθεσης και το βαθμό επικινδυνότητας κάθε μυκοτοξίνης. Σε περιοχές που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο για μόλυνση από αφλατοξίνες, είναι σημαντική η κατανόηση του τρόπου της έκθεσης (Kuiper-Goodman, 2004). Βασικό χαρακτηριστικό της εκτίμησης της έκθεσης σε παιδιά, αποτελεί η έντονη ποικιλιότητα σε παιδιά της ίδιας ηλικίας, που παρουσιάζουν συχνά τεράστιες διαφορές στην έκθεσή τους. Σε συνδυασμό με την ταχεία ανάπτυξη που εμφανίζεται κατά την παιδική ηλικία, η διακύμανση στον πληθυσμό των παιδιών περιορίζει γενικά το βαθμό στον οποίο οι σταθερές ηλικιακές ομάδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση του κινδύνου της έκθεσης (Thompson, 2004).

Μια σημαντική συνιστώσα της αξιολόγησης κινδύνου των χημικών ουσιών στα τρόφιμα είναι η εκτίμηση της έκθεσης σε χημικές ουσίες που βασίζονται στην κατανάλωση των τροφίμων. Αυτό μπορεί να είναι δύσκολο, διότι η διατροφή ενός ατόμου περιέχει μια ποικιλία ειδών, ενώ η σύνθεση των τροφίμων και ο ρυθμός κατανάλωσης διαφέρουν μεταξύ των ατόμων, ανάλογα με την ηλικία, τις εποχιακές διαφορές, και τις γεωγραφικές, πολιτισμικές και οικονομικές συνθήκες (Rees και Tennant, 1994).

Τρεις είναι οι κυριότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της έκθεσης του ανθρώπου σε χημικούς και βιολογικούς παράγοντες: τα ερωτηματολόγια, η παρακολούθηση του περιβάλλοντος, συμπεριλαμβανομένου και του προσωπικού ελέγχου, και η βιοπαρακολούθηση, παρέχοντας πληροφορίες για τις συγκεντρώσεις του παράγοντα στις οποίες το άτομο εκτίθεται, για τη διάρκεια και τη συχνότητα της έκθεσης αυτής.

Άλλα στοιχεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την αξιολόγηση, ιδίως όταν ο ανθρώπινος πληθυσμός που μελετάται περιλαμβάνει παιδιά, είναι το χρονοδιάγραμμα της έκθεσης κατά τη διάρκεια αυτών των ευαίσθητων περιόδων της ανάπτυξης (Needham και συν., 2005).

7.3.4 Τρέχουσα κατάσταση της αξιολόγησης κινδύνου των αφλατοξινών

Έχει βρεθεί ότι οι μολυσμένοι σπόροι είναι πιο τοξικοί από ό, τι θα περίμενε κανείς από την παρουσία των γνωστών μυκοτοξινών. Αυτό οφείλεται πιθανώς στην παρουσία και αλληλεπίδραση με άλλες μυκοτοξίνες ή μεταβολίτες που δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί. Αυτές οι πρόσθετες ουσίες πρέπει να ληφθούν υπόψη στη συνολική αξιολόγηση της έκθεσης και του κινδύνου για τα παιδιά (Kuiper-Goodman, 1991). Προς το παρόν, οι τοξικολογικές μελέτες απευθύνονται στις συνδυασμένες και τις πιθανώς συνεργικές επιπτώσεις ορισμένων μυκοτοξινών στην υγεία των ζωικών πληθυσμών (Tessari και συν., 2006).

Οι μέθοδοι εκτίμησης του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου σήμερα υποθέτουν ότι τα παιδιά και οι ενήλικες είναι εξίσου ευάλωτοι στην έκθεση σε χημικές ουσίες. Ωστόσο, υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν αυξημένη ευαισθησία στον καρκίνο στα πρώτα χρόνια της ζωής, ιδιαίτερα για τις χημικές ουσίες που έχουν μεταλλαξιογόνους μηχανισμούς δράσης (Barton και συν., 2005).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, οι αφλατοξίνες πρέπει να αντιμετωπίζονται ως καρκινογόνες προσμείξεις των τροφίμων, η πρόσληψη των οποίων θα πρέπει να μειωθεί στο χαμηλότερο εφικτό επίπεδο (WHO/FAO, 1997).

Η ενίσχυση της επιστημονικής βάσης για τον καθορισμό των ρυθμίσεων είναι μόνο μια πτυχή των αποτελεσμάτων της αξιολόγησης του κινδύνου, με στόχο την προστασία των καταναλωτών. Σε παγκόσμια κλίμακα, οι ισχύοντες κανονισμοί για τις μυκοτοξίνες (FAO, 2004) δείχνουν ότι περίπου 20 χώρες έχουν θεσπίσει κανόνες για τα επιτρεπόμενα επίπεδα των μυκοτοξινών σε παιδικές τροφές (22 χώρες) και στις τροφές που προορίζονται για μικρά ζώα (39 χώρες) (FAO, 2004· Sherif, 2006).

Με βάση την αξιολόγηση κινδύνου, η Ευρωπαϊκή Κοινότητα έχει θέσει στο προσκήνιο την ακόλουθη ρύθμιση για τις μυκοτοξίνες σε παιδικές τροφές:

- 0,1 µg/kg για την AFB₁, στα μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά και τις παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά, καθώς και στα διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται ειδικά για βρέφη
- 0,025 µg/kg για την AFM₁, στα παρασκευάσματα για βρέφη και παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας, συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος για βρέφη και του γάλακτος δεύτερης βρεφικής ηλικίας, καθώς και στα διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται ειδικά για βρέφη
- 0,5 µg/kg για την ωχρατοξίνη Α, στα μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά και τις παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά, καθώς και στα διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται ειδικά για βρέφη.

7.3.5 Η αξιολόγηση του κινδύνου για την AFB₁ βάσει της καρκινογενετικότητας

Ο προσδιορισμός του κινδύνου έχει οριστεί ως «η αναγνώριση των βιολογικών, χημικών και φυσικών παραγόντων στα τρόφιμα, ικανών να προκαλέσουν δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία» (FAO / WHO 2006).

Ο χαρακτηρισμός κινδύνου έχει οριστεί ως «η ποιοτική ή / και ποσοτική αξιολόγηση των αρνητικών επιπτώσεων στην υγεία που σχετίζονται με βιολογικούς, χημικούς και φυσικούς παράγοντες, που μπορεί να υπάρχουν στα τρόφιμα». Για τη χημική αξιολόγηση κινδύνου, εκτελείται μια δοσοεξαρτώμενη αξιολόγηση (FAO / WHO 2006). Για την εκτίμηση των αφλατοξινών, οι επιπτώσεις δόσης-απόκρισης έχουν εξεταστεί σε δύο διαφορετικούς τύπους (FAO / WHO 2001). Για τις μη γονοτοξικές αφλατοξίνες, έχει οριστεί ένα μέγιστο ανεκτό όριο ημερήσιας πρόσληψης. Το 1998, η JECFA εκτέλεσε μια ποσοτική εκτίμηση κινδύνου της AFB₁ (WHO, 1998), με βάση τα

δημοσιευμένα επιδημιολογικά στοιχεία του πρωτοπαθούς καρκίνου του ήπατος. Κατά την εκτίμηση της AFB₁, διαπιστώθηκε ότι, λόγω των συνεργιστικών ηπατοκαρκινογόνων επιδράσεων της αφλατοξίνης B₁ και της ηπατίτιδας B, έπρεπε να προσδιοριστούν δύο δραστηριότητες. Στα άτομα με αντιγόνο επιφάνειας για την ηπατίτιδα B (HbsAg+), η δραστηριότητα ήταν 30 φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα άτομα χωρίς αντιγόνο επιφάνειας για την ηπατίτιδα B (HbsAg-).

Η αβεβαιότητα των συγκεκριμένων εκτιμήσεων οφείλεται σε διάφορους παράγοντες:

- Τα επιδημιολογικά δεδομένα προέρχονται από περιοχές με υψηλά επίπεδα AFB₁ και υψηλά επίπεδα HbsAg+.
- Η αξιοπιστία και η ακρίβεια της αξιολόγησης της έκθεσης στην AFB₁ του πληθυσμού της μελέτης είναι άγνωστη.
- Με τη δυνατότητα αποκλεισμού των μελετών δεν καταδεικνύεται συσχέτιση μεταξύ της AFB₁ και του καρκίνου του ήπατος.
- Τα ποσοτικοποιημένα επίπεδα έκθεσης στην AFB₁ δεν αντιπροσωπεύουν τα επίπεδα κατά την επαγωγή του καρκίνου.
- Οι μη επαρκείς μέθοδοι περιορίζουν την ανίχνευση της ηπατίτιδας B.
- Με τη χρήση ιστολογικών μεθόδων δεν επιβεβαιώνεται ο πρωτοπαθής καρκίνος του ήπατος (EFSA, 2007).

Παρ' όλο που οι εκτιμώμενες δραστηριότητες από μελέτες σε ζώα εμπίπτουν στα ίδια επίπεδα, η προέκταση της στον άνθρωπο είναι δύσκολη λόγω του γεγονότος ότι η σχέση δόσης-απόκρισης είναι άγνωστη, αλλά και λόγω των μεγάλων διαφορών που υπάρχουν μεταξύ των ειδών των ζώων, εξαιτίας των διαφορών στα ποσοστά της ενεργοποίησης και αποτοξίνωσης της αφλατοξίνης B₁ (WHO, 1998).

7.3.6 Αξιολόγηση της έκθεσης στις αφλατοξίνες

Αξιολόγηση της έκθεσης έχει οριστεί ως «η ποιοτική ή / και ποσοτική αξιολόγηση της πιθανής πρόσληψης βιολογικών, χημικών ή φυσικών παραγόντων μέσω της τροφής, καθώς και εκθέσεις από άλλες πηγές, ανάλογα με την περίπτωση» (FAO / WHO 2006). Ενώ η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός του κινδύνου αφορούν στις καθολικές ιδιότητες του μολυσματικού παράγοντα, η εκτίμηση της έκθεσης είναι μια μεταβλητή σε πληθυσμούς και σε υποομάδες των πληθυσμών. Η αξιολόγηση της έκθεσης εξαρτάται από τα επίπεδα μόλυνσης και από τις ποσότητες των μολυσμένων τροφίμων που καταναλώνονται. Ο συνδυασμός των στατιστικών μοντέλων, όπως η μέθοδος Monte

Carlo, και στοιχεία για τα επίπεδα μόλυνσης των τροφίμων και την κατανάλωσή τους, παρέχουν ένα ισχυρό εργαλείο για τον καθορισμό της κατανομής της έκθεσης διαφορετικών κοινοτήτων στις αφλατοξίνες.

Αν και η αξιολόγηση της έκθεσης απεικονίζεται καλύτερα από τα στοιχεία διανομής, η έλλειψη λεπτομερών στοιχείων για τα επίπεδα μόλυνσης και κατανάλωσης στις χώρες της Αφρικής αντιστατεύεται τη χρήση μοντέλων πιθανοτήτων. Παρ' όλα αυτά, οι προσδιορισμοί που βασίζονται σε μέσα επίπεδα μπορούν να προσφέρουν πληροφορίες για την έκθεση σε αφλατοξίνες. Η υψηλή έκθεση μπορεί να προκληθεί, είτε από τα υψηλά επίπεδα μόλυνσης των τροφίμων που καταναλώνονται σε μέτριες ποσότητες, είτε από τη μεγάλη κατανάλωση μέτρια μολυσμένων τροφίμων. Δυστυχώς, σε πολλές αγροτικές κοινότητες της Αφρικής, τα βασικά τρόφιμα που καταναλώνονται σε μεγάλες ποσότητες είναι μολυσμένα από αφλατοξίνες. Η διατροφική έκθεση σε αφλατοξίνες μπορεί να υπολογιστεί από την ακόλουθη εξίσωση, η οποία σχετίζεται με τα επίπεδα μόλυνσης από αφλατοξίνες (ng/g τροφής) στα τρόφιμα, το πραγματικό ποσό της τροφής που καταναλώνεται ημερησίως (g τροφής/ημέρα) και το σωματικό βάρος του ατόμου (σε kg):

$$\text{Έκθεση (ng/kg σωματικού βάρους/ημέρα)} = (\text{Επίπεδο μόλυνσης}) * (\text{Ποσό κατανάλωσης}) / (\text{Σωματικό βάρος})$$

Ο Πίνακας 7.1 περιέχει ορισμένα επιλεγμένα παραδείγματα διαφόρων βασικών προϊόντων τροφίμων που προέρχονται από όλη την Αφρική. Το καλαμπόκι στην Κένυα καταναλώνεται στο επίπεδο των 400 g/ άτομο την ημέρα (Muriuki και Siboe, 1995). Στο αλεύρι καλαμποκιού βρέθηκαν επίπεδα ολικής αφλατοξίνης της τάξεως των 20 ng/g. Παρόλο που δεν ορίζεται ανώτατο επίπεδο ανοχής για την αφλατοξίνη στο καλαμπόκι στην Κένυα, έχουν νομοθετηθεί τα 20 ng/g ως το ανώτατο επίπεδο ανοχής για τις συνολικές αφλατοξίνες σε όλες τις τροφές εκτός από το γάλα (FAO, 2004). Ωστόσο, οι συνέπειες της υψηλής κατανάλωσης καλαμποκιού είναι η μεγάλη έκθεση σε αφλατοξίνες της τάξεως των 133 ng/kg σωματικού βάρους / ημέρα, παρόλο που το επίπεδο μόλυνσης μπορεί να θεωρηθεί ως αποδεκτό από τις ΗΠΑ. Στις αγροτικές περιοχές, η κατάσταση μπορεί να είναι χειρότερη. Πρόσφατες έρευνες που έλαβαν χώρα στις αγροτικές περιοχές της Κένυας, που έχουν πληγεί από την εμφάνιση αφλατοξίκωσης στον άνθρωπο, έδειξαν ότι τα μέσα επίπεδα μόλυνσης του αραβοσίτου

ήταν 53 ng/ g, με αποτέλεσμα τα επίπεδα της μέσης έκθεσης να ανέρχονται στα 353 ng/ kg σωματικού βάρους ανά ημέρα (Lewis και συν., 2005). Ωστόσο, στην περίπτωση της οξείας τοξικότητας ανθρώπου, τα μέγιστα επίπεδα μόλυνσης είναι πιο κατατοπιστικά. Κατά τη διάρκεια έρευνας που πραγματοποιήθηκε στην περιοχή Makueni, το 12% των δειγμάτων που συλλέχθηκαν είχαν επίπεδα αφλατοξίνης >1000 ng/g, και η μέγιστη συγκέντρωση που βρέθηκε ήταν 5400 ng/g. Λαμβάνοντας υπόψη το μεγάλο εύρος και την ασύμμετρη κατανομή της πιθανής μόλυνσης από αφλατοξίνες, η χρήση των μέσων όρων ή διαμέσων τιμών των επιπέδων μόλυνσης σε όλη την περιοχή μπορεί να οδηγήσει σε υποτίμηση της πραγματικής έκθεσης μεγάλου αριθμού ατόμων σε αυτές τις αγροτικές περιοχές. Αυτό ισχύει ιδίως στην περίπτωση που τα τρόφιμα που καταναλώνονται προέρχονται από ένα κατάστημα στο οποίο τα επίπεδα αφλατοξίνης έχουν αυξηθεί λόγω των ακατάλληλων συνθηκών. Η υπερβολική κατανάλωση ενός τροφίμου που ενδέχεται να έχει μολυνθεί μπορεί επίσης να έχει σοβαρές συνέπειες. Ο πίνακας 7.1 παρουσιάζει παρόμοια παραδείγματα της έκθεσης σε φιστικοβούτυρο στην Μποτσουάνα και μύρα στην Τανζανία. Εκτός από την υψηλή κατανάλωση ενός και μόνο μολυσμένου διατροφικού παράγοντα, ένας επιπλέον παράγοντας σε ορισμένες αφρικανικές χώρες θα μπορούσε να χαρακτηρίσει την κατάσταση στην Γκάμπια, όπου όλα τα εναλλακτικά βασικά τρόφιμα, όπως το καλαμπόκι, το ρύζι και τα αράπικα φιστίκια, μολύνονται από αφλατοξίνες, και η συνολική έκθεση αποτελεί το άθροισμα της έκθεσης σε μεμονωμένες πηγές. Σε αυτήν την περίπτωση, η αλλαγή των διατροφικών προτύπων δεν βελτιώνει απαραίτητα τα επίπεδα της έκθεσης, αν και πρόσφατες μελέτες στη Νιγηρία έχουν δείξει ότι αυτόχθονα δημητριακά της Αφρικής, όπως ο σόργος και το κεχρί, τείνουν να έχουν χαμηλότερα επίπεδα μόλυνσης σε σύγκριση με το καλαμπόκι (Bandyopadhyay και συν., 2007). Σε μια τέτοια περίπτωση, η επιστροφή σε διατροφή που περιέχει σόργο και κεχρί, αντί του αραβόσιτου, μπορεί να αποτελέσει μέτρο μείωσης της έκθεσης σε αφλατοξίνες.

7.3.7 Χαρακτηρισμός κινδύνου αφλατοξινών

Ο πίνακας 7.1 παρέχει στην τελευταία στήλη μία εκτίμηση για τον κίνδυνο του πληθυσμού (εκφραζόμενος ως καρκίνοι ετησίως ανά 100.000 πληθυσμού) για πρωτοπαθή καρκίνο του ήπατος από έκθεση σε AFB₁. Ο κίνδυνος του πληθυσμού λαμβάνεται ως το γινόμενο των δεδομένων της έκθεσης και της μέσης τιμής ισχύος των HbsAg+ και HbsAg- ομάδων, στις οποίες το ποσοστό επικράτησης στα άτομα HbsAg+ θεωρήθηκε ότι ήταν 25% για τις αναπτυσσόμενες χώρες (WHO, 1998).

Τα στοιχεία του πίνακα 7.1 δείχνουν, σε ορισμένες περιπτώσεις, πολύ υψηλό κίνδυνο του πληθυσμού στην έκθεση σε αφλατοξίνες. Μεταξύ των διαφόρων χωρών τα πραγματικά ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του ήπατος διαφέρουν σημαντικά.

Πίνακας 7.1. Κατανάλωση μολυσμένων με αφλατοξίνες τροφίμων, έκθεση και κίνδυνος καρκίνου του ήπατος σε χώρες της Αφρικής (Shephard, 2008)

Χώρα	Τρόφιμο	Μόλυνση (ng/g)	Κατανάλωση (g τροφής / ημέρα)	Έκθεση (ng/kg σωματικού βάρους/ ημέρα)	Κίνδυνος πληθυσμού για πρωτογενή καρκίνο του ήπατος (καρκίνοι / έτος / 100.000 πληθυσμού)
Κένυα	Αραβόσιτος	20	400	133	11
Κένυα	Αραβόσιτος	53	400	353	29,2
Γκάνα	Kenkey	51	1000	850	70,1
Μποτσουάνα	Φιστικοβούτυρο	23	20	7,6	1,9
Μπενίν	Γλυκοπατάτα	19	332	105	8,7
Γανζανία	Μπύρα	23	1048	402	33,1
Γκάμπια	Αραβόσιτος	9,7	22	3,6	0,3
Γκάμπια	Κεχρί	9,8	181	30	2,4
Γκάμπια	Σόργο	2,3	37	1,4	0,1
Γκάμπια	Ρύζι	7,9	103	14	1,1
Γκάμπια	Αράπικα φιστίκια	15	65	16	13

Όπως έχει αποδειχθεί, η μείωση του κινδύνου των αφλατοξινών περιλαμβάνει τη μείωση των επιπέδων μόλυνσης και κατανάλωσης. Είναι σαφές ότι, αν για όλα τα τρόφιμα ίσχυαν τα ανώτατα επιτρεπτά όρια που έχει θέσει η Ευρωπαϊκή Ένωση (2

μg/kg AFB₁ στα αράπικα φιστίκια και τα δημητριακά για άμεση ανθρώπινη κατανάλωση) (FAO, 2004), τότε ο κίνδυνος δε θα ήταν υψηλός. Στα επίπεδα μόλυνσης που περιγράφονται στον πίνακα 7.1, μόνο η μέτρια πρόσληψη μπορεί να διατηρήσει τους κινδύνους σε αποδεκτά επίπεδα.

Κατά την εκτίμηση της Ευρωπαϊκής Ένωσης, οι κίνδυνοι του καρκίνου του ήπατος στις περισσότερες χώρες μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης θα πρέπει να υπολογίζονται σε ισχύ σχετική με τις χώρες της χαμηλής επικράτησης (1%) των HbsAg+ δηλαδή 0,013 καρκίνοι ανά έτος ανά 100.000 ανά ng AFB₁ ανά kg σωματικού βάρους ανά ημέρα. Παρότι οι εκτιμήσεις του κινδύνου της αφλατοξίνης από διεθνείς οργανισμούς έχουν ως βάση τις καρκινογενείς δραστηριότητες που αναπτύχθηκαν από την JECFA, τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκε η δόση του σημείου αναφοράς (benchmark dose - BMD). Η BMD, η οποία συστάθηκε με δημιουργία προτύπου, αντιπροσωπεύει μια εκτίμηση της δόσης που απαιτείται για την παραγωγή μικρής απόκρισης (1-10%) πάνω από τον μάρτυρα.

Ο Hoseyni (1992) αξιολόγησε διάφορα πρότυπα με κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του ήπατος, και κατέληξε σε μία αξιολόγηση του εκτιμώμενου συντελεστή δόσης-απόκρισης για τις αφλατοξίνες στις ΗΠΑ. Αυτή η ανάλυση κινδύνου μεταφράζεται σε εκτιμώμενο επίπεδο πρόσληψης μεταξύ 253 και 441 ng/ ημέρα (βασισμένο στο 95% του ανώτατου ορίου και στα μοντέλα βέλτιστης εκτίμησης, αντίστοιχα). Τέλος, αντιστοιχεί σε κίνδυνο καρκίνου του ήπατος της τάξεως 1×10^{-5} στις ΗΠΑ, με την προϋπόθεση ότι η μέση διάρκεια ζωής είναι τα 70 χρόνια, το μέσο σωματικό βάρος 70 kg και ο επιπολασμός της ηπατίτιδας 1%.

Ο Bruce (1990) αναφέρει μια εκτίμηση των 322 ng/ ημέρα για το ίδιο επίπεδο κινδύνου. Τα αποτελέσματα μιας έρευνας των μέγιστων ανεκτών επιπέδων αφλατοξινών στα τρόφιμα από τον FAO (1997) συνοψίζονται από τους Boutrif και Canet (1998). Στον πίνακα 7.2 απεικονίζονται τα επιτρεπτά επίπεδα αφλατοξίνης σε διάφορες χώρες. Στην Ινδία τα επιτρεπτά όρια αγγίζουν τα 30 μg/ kg, όπως είχαν αρχικά οριστεί από τον FAO/WHO, ενώ σε άλλες χώρες τα ανώτερα επιτρεπτά όρια έχουν οριστεί στα 5μg/kg. Τα όρια που έθεσε η Ευρωπαϊκή Ένωση είναι τα 2μg/kg για τα αράπικα φιστίκια, καρύδια, αποξηραμένα φρούτα και δημητριακά και τα προϊόντα τους, που προορίζονται για άμεση ανθρώπινη κατανάλωση ή ως συστατικά τροφίμων.

Αν η μόλυνση του αραβοσίτου στην Ευρωπαϊκή Ένωση μειωθεί με επιτυχία στα < 2μg/kg, στη συνέχεια, για να επιτευχθεί μια έκθεση 441 ng αφλατοξίνης/ ημέρα θα απαιτούσε την κατανάλωση περισσότερων από 200 g καλαμποκιού/ ημέρα (Η εκτιμώμενη κατανάλωση στις ΗΠΑ ήταν 44 g/ ημέρα).

Πίνακας 7.2. Ανώτατα επιτρεπτά επίπεδα αφλατοξίνης B₁ στα τρόφιμα (Boutrif και Canet, 1998)

Χώρα	Ανώτατα επιτρεπόμενα επίπεδα (μg/kg)	Προϊόντα
Αργεντινή	0	Αράπικα φιστίκια, αραβόσιτος και παράγωγα
Βραζιλία	15	Σε όλα τα τρόφιμα
Κίνα	10	Ρύζι και βρώσιμα έλαια
Τσεχία	5	Σε όλα τα τρόφιμα
Ουγγαρία	5	Σε όλα τα τρόφιμα
Ινδία	30	Σε όλα τα τρόφιμα
Ιαπωνία	10	Σε όλα τα τρόφιμα
Νιγηρία	20	Σε όλα τα τρόφιμα
Πολωνία	0	Σε όλα τα τρόφιμα
Νότια Αφρική	5	Σε όλα τα τρόφιμα
Ζιμπάμπουε	5	Σε όλα τα τρόφιμα

7.4 Νομοθεσία

Οι τρέχουσες επιστημονικές και τεχνικές γνώσεις, καθώς και οι εφαρμοζόμενες πρακτικές παραγωγής και αποθήκευσης, δεν μπορούν να αποκλείσουν την ανάπτυξη των μυκήτων *Aspergillus*, και, κατά συνέπεια, δεν είναι δυνατό να απαλειφθούν πλήρως οι αφλατοξίνες από τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Συνιστάται, επομένως, να περιορίζεται η παρουσία τους στο κατώτατο εύλογα εφικτό επίπεδο. Η μείωση της έκθεσης του ανθρώπου, αλλά και των παραγωγικών ζώων, σε αυτού του είδους τις τοξικές ουσίες αποτελεί μέγιστη προτεραιότητα, διότι οι επιδράσεις στην υγεία τους είναι σημαντικές. Αυτό διασφαλίζεται, ως ένα βαθμό, με τη θέσπιση νομοθετικών πλαισίων, που καθορίζουν τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τη συγκέντρωση των αφλατοξινών στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές.

7.4.1 Παγκόσμια επιτρεπτά επίπεδα αφλατοξινών

Εφόσον πρόκειται για εξαιρετικά τοξικές, καρκινογόνες, μεταλλαξιογόνες και ανοσοκατασταλτικές ουσίες, οι αφλατοξίνες δεν μπορούσαν παρά να τραβήξουν την προσοχή διεθνών και εθνικών οργανισμών. Αυτοί θέσπισαν, με διαφορετικό τρόπο στις διάφορες χώρες, κανόνες για το συστηματικό έλεγχο τροφών με υψηλό κίνδυνο μόλυνσης από αφλατοξίνες, και συγκεκριμένα όρια συγκέντρωσης των ουσιών αυτών στα διάφορα τρόφιμα.

Οι αφλατοξίνες θεωρούνται αναπόφευκτες προσμείξεις των τροφίμων και των ζωοτροφών, ακόμη και όταν τηρούνται όλες οι σωστές παρασκευαστικές τεχνικές. Η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration - FDA) των ΗΠΑ έχει θεσπίσει ειδικές κατευθυντήριες γραμμές για τα αποδεκτά επίπεδα αφλατοξινών στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές, με τον καθορισμό των επιπέδων δράσης που επιτρέπουν την απομάκρυνση των παραβατικών παρτίδων από το εμπόριο. Ωστόσο, είναι πολύ δύσκολο να υπολογιστεί με ακρίβεια η συγκέντρωση αφλατοξινών σε μία παρτίδα.

Πάνω από 100 χώρες παγκοσμίως έχουν θεσπίσει νομοθετικές διατάξεις που αφορούν τις αφλατοξίνες και τη συγκέντρωσή τους σε τρόφιμα ή ζωοτροφές.

Οι αφλατοξίνες ρυθμίζονται διαφορετικά από τα προσθετικά τροφίμων και άλλες χημικές ουσίες που περιλαμβάνονται στα τρόφιμα. Στις αναπτυγμένες χώρες, οι ανθρώπινοι πληθυσμοί προστατεύονται, διότι με τον τακτικό έλεγχο τα μολυσμένα τρόφιμα απομακρύνονται. Δυστυχώς, στις χώρες του τρίτου κόσμου, οι κανονισμοί είναι ανύπαρκτοι ή αν υπάρχουν δεν εφαρμόζονται, μια και οι προσπάθειες στρέφονται στην καταπολέμηση της φτώχειας και της μετάδοσης μικροβιακών ασθενειών, όπως το AIDS στην Αφρική· οπότε, η μόλυνση από τις αφλατοξίνες είναι πολύ συχνή (FAO, 1997).

Εκτός από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων στις ΗΠΑ, αρκετές ευρωπαϊκές χώρες έχουν εγκαθιδρύσει ειδικές επιτροπές για την δημιουργία κανονισμών και κατευθυντήριων γραμμών και τυποποιημένων πρωτόκολλων ανάλυσης. Οι εκτιμήσεις των «ασφαλών δόσεων» συνήθως αναφέρονται ως «ανεκτή ημερήσια πρόσληψη». Για παράδειγμα, στις Ηνωμένες Πολιτείες, η κατευθυντήρια γραμμή από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων είναι 20 ppb ολικής αφλατοξίνης σε τρόφιμα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση και 100 ppb είναι το όριο για την εκτροφή βοοειδών και πουλερικών (FDA, 1998· Bennett και συν., 2007). Σύμφωνα με τον Tedesco και τους συνεργάτες του (2008), μερικές χώρες ρυθμίζουν τα επίπεδα της AFB₁ σε ζωοτροφές που προορίζονται για ζώα γαλακτοπαραγωγής. Ο περιορισμός της αφλατοξίνης B₁ στις ζωοτροφές είναι το πλέον αποτελεσματικό μέσο για τον έλεγχο της

αφλατοξίνης M_1 στο γάλα. Το όριο των 5 μg της αφλατοξίνης B_1/kg στις ζωοτροφές για τις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής και των 20 μg στις ζωοτροφές για βοοειδή κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης, πρόβατα, αίγες, χοίρους και τα πουλερικά, εφαρμόζονται στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Τα όρια αυτά εφαρμόζονται στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ζώνης Ελεύθερου Εμπορίου, σε πολλές από τις υποψήφιες χώρες της ΕΕ και σποραδικά εκτός Ευρώπης. Το όριο των 20 μg αφλατοξίνης B_1/kg στις ζωοτροφές για τα ζώα γαλακτοπαραγωγής και το όριο των 100 μg στις ζωοτροφές που προορίζονται για την εκτροφή βοοειδών, χοιροειδών ή ώριμων πουλερικών, εφαρμόζονται στις Ηνωμένες Πολιτείες, την Αφρική και τη Λατινική Αμερική (FAO, 2005). Στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και σε ορισμένες χώρες στην Αφρική, την Ασία και τη Λατινική Αμερική, ισχύει το μέγιστο επίπεδο του 0,05 μg M_1/kg στο γάλα και το ανώτατο επίπεδο του 0,025 μg αφλατοξίνης M_1/kg στο βρεφικό γάλα. Λαμβάνοντας υπ' όψη τις ανησυχίες για τη δημόσια υγεία, η Ευρωπαϊκή Ένωση συνεχίζει να διατηρεί το μέγιστο επίπεδο της τάξεως του 0,05 ppb αφλατοξίνης M_1 στο γάλα και 0,025 ppb σε γαλακτοκομικά τρόφιμα για βρέφη (CCFAC, 1999· 2000· 2001). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τους κανονισμούς στην Αμερική, όπου το ανώτατο επιτρεπόμενο επίπεδο αφλατοξίνης στο γάλα είναι 0,5 ppb. Βάσει της επίδρασης των επιπέδων αφλατοξίνης στην υγεία του ανθρώπου και των ζώων, μετά από μελέτες που δημοσιεύτηκαν από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας το 2005, είναι γνωστό ότι ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του ήπατος είναι σχεδόν μηδενικός, αν οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται από 0,05 ppb έως 0,5 ppb.

Στις χώρες που ισχύει το ανώτατο επιτρεπτό όριο αφλατοξίνης M_1 στο 0,5 ppb πιστεύουν ότι οι εν λόγω συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν δυσμενείς οικονομικές συνέπειες, λόγω της δυσκολίας των εξαγωγών γάλακτος σε χώρες που ισχύει το μέγιστο όριο των 0,05 ppb. Επιπλέον, πιστεύεται ότι το επίπεδο του 0,05 ppb είναι δύσκολο να επιτευχθεί στις περισσότερες περιοχές του κόσμου, και έτσι θεωρείται ότι το όριο της τάξης του 0,5 ppb είναι αρκετό για να προωθήσει την προστασία της δημόσιας υγείας. Συμπερασματικά, είναι σημαντικό να ενοποιηθούν παγκοσμίως οι κανονισμοί των επιτρεπόμενων επιπέδων αφλατοξίνης, προκειμένου να αποφευχθούν οι κίνδυνοι και τα προβλήματα υγείας που προκύπτουν από την εισαγωγή και εξαγωγή μολυσμένων τροφίμων.

7.4.2 Ευρωπαϊκή νομοθεσία

Η κοινοτική νομοθεσία όρισε μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τη συγκέντρωση των αφλατοξινών στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές, με την έκδοση του «Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 της Επιτροπής, της 19^{ης} Δεκεμβρίου 2006, για τον καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα», ο οποίος βέβαια αφορά σε πλήθος ουσιών, και τροποποιήθηκε πρόσφατα, με τον «Κανονισμό (ΕΕ) 165/2010 της Επιτροπής, της 26^{ης} Φεβρουαρίου 2010, για την τροποποίηση του Καν. 1881/2006, αναφορικά με τις αφλατοξίνες».

Ενδεικτικά, η νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης καθορίζει ως μέγιστες τιμές ανοχής (σε $\mu\text{g/kg}$) για την AFB_1 και το άθροισμα των αφλατοξινών B_1 , B_2 , G_1 και G_2 , καθώς και για την AFM_1 στο γάλα :

- Για όλα τα δημητριακά και τα παράγωγά τους : 2 $\mu\text{g/kg}$ (AFB_1) και 4 $\mu\text{g/kg}$ (άθρ.)
- Για τα ξηρά φρούτα, που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο : 2 $\mu\text{g/kg}$ (AFB_1) και 4 $\mu\text{g/kg}$ (άθρ.)
- Για τα αράπικα φιστίκια (αραχίδες) και άλλους ελαιόσπορους, που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο : 2 $\mu\text{g/kg}$ (AFB_1) και 4 $\mu\text{g/kg}$ (άθρ.)
- Για αμύγδαλα, φιστίκια και πυρήνες βερίκοκων, που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο : 8 $\mu\text{g/kg}$ (AFB_1) και 10 $\mu\text{g/kg}$ (άθρ.)
- Για διάφορα καρυκεύματα (μαύρο και λευκό πιπέρι, μοσχοκάρυδο, κούρκουμα) : 5 $\mu\text{g/kg}$ (AFB_1) και 10 $\mu\text{g/kg}$ (άθρ.)
- Για το νωπό γάλα: 0,05 $\mu\text{g/kg}$ (AFM_1)
- Για το βρεφικό γάλα και το γάλα δεύτερης βρεφικής ηλικίας: 0,025 $\mu\text{g/kg}$ (AFM_1)

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, αν και η αφλατοξίνη AFM_1 θεωρείται λιγότερο επικίνδυνη από ό, τι η AFB_1 , η νομοθεσία προβλέπει όρια συγκέντρωσης στο γάλα, ώστε να εμποδιστεί η παρουσία της - στη συνέχεια - και στα γαλακτοκομικά προϊόντα από το γάλα αυτό, που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, και ιδιαίτερα για μικρά παιδιά. Έτσι, οι περισσότερες από τις αναπτυγμένες χώρες έχουν θεσπίσει νομοθετικά πλαίσια που ορίζουν τα μέγιστα επιτρεπόμενα όρια αφλατοξίνης M_1 στο γάλα, τα οποία όμως ποικίλλουν από χώρα σε χώρα.

Σύμφωνα με μια πρόσφατη έρευνα για λογαριασμό του FAO (FAO, 2004) περίπου 60 χώρες έχουν θέσει συγκεκριμένα όρια για την αφλατοξίνη M_1 . Στην ΕΕ, τα νέα κράτη μέλη, εφαρμόζουν γενικά ένα μέγιστο επίπεδο του 0,05 μg αφλατοξίνης M_1/kg

γάλακτος. Ορισμένες χώρες στην Αφρική, την Ασία και τη Λατινική Αμερική επίσης προτείνουν αυτό το επίπεδο. Σε αντίθεση, οι ΗΠΑ, καθώς και ορισμένες ευρωπαϊκές και πολλές ασιατικές χώρες, δέχονται ως μέγιστο επίπεδο της αφλατοξίνης M_1 , το 0,5 μg αφλατοξίνης M_1/kg γάλακτος. Το 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ως όριο για την αφλατοξίνη M_1 , έχει υιοθετηθεί από τον Codex Alimentarius [Ο «Κώδικας τροφίμων» οργανώθηκε από κοινού στη δεκαετία του '60 από δύο οργανώσεις των Ηνωμένων Εθνών: τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO)]. Έτσι, το ανώτατο επιτρεπόμενο επίπεδο αφλατοξίνης M_1 στο γάλα στην ΕΕ είναι από τα χαμηλότερα στον κόσμο (EFSA, 2004).

Για το τυρί δεν έχουν θεσπιστεί όρια από την Ευρωπαϊκή Ένωση, ενώ η Τουρκία και η Ελβετία έχουν ορίσει ως όριο ανοχής για την αφλατοξίνη M_1 στο τυρί, τα 250 ng/kg (Prandini και συν., 2009· Tekinsen και Ukar, 2008).

Λαμβάνοντας υπ' όψη τις διαπιστωμένες δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία των ζώων και την επακόλουθη μεταφορά στο γάλα, περίπου 45 χώρες έχουν ορίσει συγκεκριμένα επίπεδα για την αφλατοξίνη B_1 στις ζωοτροφές που προορίζονται για ζώα γαλακτοπαραγωγής (Van Egmond και Jonker, 2003). Για τη συμμόρφωση με τα ανώτατα όρια στο γάλα που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση, αυστηρά ανώτατα επίπεδα θεσπίστηκαν επίσης και στην Ευρωπαϊκή Ένωση για τις ζωοτροφές που μπορεί να καταναλωθούν από τις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Το όριο των 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, για τις ζωοτροφές που προορίζονται για αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, εφαρμόζεται στις χώρες της ΕΕ και στα νέα κράτη μέλη, αλλά μόνο σε λίγες χώρες εκτός Ευρώπης.

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με τον Ενιαίο Φορέα Ελέγχου Τροφίμων (ΕΦΕΤ), ως «πρόσμειξη» νοείται οιαδήποτε ουσία δεν προστίθεται σκοπίμως στο τρόφιμο, αλλά περιέχεται σε αυτό, ως αποτέλεσμα της παραγωγής, της παρασκευής, της μεταποίησης, της προετοιμασίας, της επεξεργασίας, της πρώτης και της δεύτερης συσκευασίας, της μεταφοράς ή αποθήκευσης του εν λόγω τροφίμου ή ως αποτέλεσμα της μόλυνσης από το περιβάλλον. Οι ξένες ύλες, όπως για παράδειγμα, υπολείμματα εντόμων, τρίχες ζώων και άλλα, δεν καλύπτονται από τον ορισμό αυτό.

Ο ΕΦΕΤ είναι ενεργός στον έλεγχο των γαλακτοκομικών προϊόντων όσον αφορά τη συγκέντρωσή τους σε αφλατοξίνες. Έτσι, πολλές φορές προχωρά σε ενημέρωση σχετικά με ανάκληση προϊόντων που δεν τηρούν τα επιτρεπτά όρια.

Ο πίνακας 7.3 περιέχει τα μέγιστα επιτρεπόμενα όρια συγκέντρωσης αφλατοξινών στα διάφορα τρόφιμα, όπως διαμορφώθηκαν σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΕ) αριθ.

165/2010 της Επιτροπής της 26^{ης} Φεβρουαρίου 2010, για την τροποποίηση του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1881/2006, αναφορικά με τις αφλατοξίνες.

Πίνακας 7.3. Μέγιστα επιτρεπόμενα όρια συγκέντρωσης αφλατοξινών στα τρόφιμα (από http://ec.europa.eu/index_el.htm)

Τρόφιμα		Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (µg/kg)		
	Αφλατοξίνες	B ₁	Αθροισμα της αφλατοξίνης B ₁ , B ₂ , G ₁ και G ₂	M ₁
1	Αραχίδες (αράπικα φιστίκια) και άλλοι ελαιούχοι σπόροι, που προορίζονται να υποστούν κατεργασία διαλογής ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από κάθε κατανάλωση από τον άνθρωπο ή χρήση ως συστατικά τροφίμων με εξαίρεση: - τις αραχίδες (αράπικα φιστίκια) και άλλους ελαιούχους σπόρους που προορίζονται για σύνθλιψη για την παραγωγή εξευγενισμένου φυτικού ελαίου	8.0	15.0	-
2	Αμύγδαλα, φιστίκια Αιγίνης και πυρήνες βερίκοκων, που προορίζονται να υποστούν κατεργασία διαλογής ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από κάθε κατανάλωση από τον άνθρωπο ή χρήση ως συστατικά τροφίμων	12.0	15.0	-
3	Φουντούκια και καρύδια Βραζιλίας, που προορίζονται να υποστούν κατεργασία διαλογής ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από κάθε κατανάλωση από τον άνθρωπο ή χρήση ως συστατικά τροφίμων	8.0	15.0	
4	Καρποί με κέλυφος, εκτός από τους καρπούς με κέλυφος που αναφέρονται στα σημεία 2 και 3, που προορίζονται να υποστούν κατεργασία διαλογής ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από κάθε κατανάλωση από τον άνθρωπο ή χρήση ως συστατικά τροφίμων	5.0	10.0	-
5	Αραχίδες (αράπικα φιστίκια) και άλλοι ελαιούχοι σπόροι και μεταποιημένα προϊόντα τους, που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά τροφίμων, με εξαίρεση: - τα ακατέργαστα φυτικά έλαια που προορίζονται για εξευγενισμό - τα εξευγενισμένα φυτικά έλαια	2.0	4.0	-
6	Αμύγδαλα, φιστίκια Αιγίνης και πυρήνες βερίκοκων, που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά τροφίμων	8.0	10.0	-
7	Φουντούκια και καρύδια Βραζιλίας, που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά τροφίμων	5.0	10.0	
8	Καρποί με κέλυφος, εκτός από τους καρπούς με κέλυφος που αναφέρονται στα σημεία 6 και 7, και μεταποιημένα προϊόντα τους, που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά τροφίμων	2.0	4.0	-
9	Ξηρά φρούτα που προορίζονται να υποστούν κατεργασία διαλογής ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από κάθε κατανάλωση από τον άνθρωπο ή χρήση ως συστατικά τροφίμων	5.0	10.0	-

Τρόφιμα		Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (μg/kg)		
10	Ξηρά φρούτα και μεταποιημένα προϊόντα τους, που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά τροφίμων	2,0	4,0	-
11	Όλα τα δημητριακά και όλα τα παράγωγα προϊόντα τους, συμπεριλαμβανομένων των μεταποιημένων προϊόντων δημητριακών, εξαιρουμένων των τροφίμων που παρατίθενται στα σημεία 12, 15 και 17	2,0	4,0	-
12	Ο αραβόσιτος και το ρύζι που προορίζονται να υποστούν κατεργασία διαλογής ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από κάθε κατανάλωση από τον άνθρωπο ή χρήση ως συστατικά τροφίμων	5,0	10,0	-
13	Νωπό γάλα, γάλα που υφίσταται θερμική επεξεργασία και γάλα για την παρασκευή προϊόντων με βάση το γάλα	-	-	0,050
14	Τα εξής είδη καρυκευμάτων: <i>Capsicum spp</i> (αποξηραμένοι καρποί, ολόκληροι ή αλεσμένοι, συμπεριλαμβανομένου του τσίλι, του τσίλι σε σκόνη, του καγιέν και της πάπρικας) <i>Piper spp</i> (καρποί, συμπεριλαμβανομένου του λευκού και του μαύρου πιπεριού) <i>Myristica fragrans</i> (μοσχοκάρυδο) <i>Zingiber officinale</i> (ζιγγίβερη) <i>Curcuma longa</i> (κούρκουμα) Μείγματα καρυκευμάτων που περιέχει ένα ή περισσότερα από τα προαναφερόμενα καρυκεύματα	5,0	10,0	-
15	Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά	0,10	-	-
16	Παρασκευάσματα για βρέφη και παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας, συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος για βρέφη και του γάλακτος δεύτερης βρεφικής ηλικίας	-	-	0,025
17	Διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται ειδικά για βρέφη	0,10	-	0,025

8. ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΕΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ

Παράλληλα με τις επιπτώσεις των αφλατοξινών, και γενικότερα των μυκοτοξινών, στη δημόσια υγεία, εξελίσσονται οι επιπτώσεις των ουσιών αυτών στο οικονομικό πεδίο. Η επιστημονική κοινότητα ομόφωνα συμφωνεί ότι οι αφλατοξίνες στα τρόφιμα θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε οικονομικές απώλειες με διάφορους τρόπους, όπως, απώλεια της ζωής ανθρώπων και ζώων, απορρίψεις εμπορευμάτων, απώλεια των πόρων διαβίωσης, απόρριψη τροφίμων, κόστος ανθρώπινης υγειονομικής περίθαλψης, κτηνιατρικά έξοδα, απώλεια εισοδήματος μέσω της απώλειας παραγωγής των ζωικών πληθυσμών, κτηνοτροφικών φυτών και ζωοτροφών, το κόστος παρακολούθησης τροφογενών ασθενειών και παρακολούθησης τροφών, το κόστος της έρευνας με επίκεντρο την μείωση των επιπτώσεων και της σοβαρότητας του προβλήματος (Hussein και Brasel, 2001).

Οι μυκοτοξίνες έχουν σημαντικό οικονομικό και εμπορικό αντίκτυπο, δεδομένου ότι, τόσο η παραγωγικότητα, όσο και η θρεπτική αξία των μολυσμένων ζωοτροφών και των δημητριακών επηρεάζονται (Ratcliff, 2002). Επίσης, οι σημαντικές οικονομικές ζημιές σχετίζονται με τις επιπτώσεις τους στην υγεία του ανθρώπου, της παραγωγικότητας των ζώων αλλά και στο εγχώριο και διεθνές εμπόριο. Εκτιμάται ότι το 25% των καλλιεργειών στον κόσμο, συμπεριλαμβανομένων πολλών βασικών τροφίμων, επηρεάζονται από τους μύκητες που παράγουν μυκοτοξίνες. Σύμφωνα με τις εκτιμήσεις του FAO, οι συνολικές απώλειες των τροφίμων λόγω των μυκοτοξινών είναι της τάξης των 1000 εκατομμυρίων τόνων ετησίως. Η θρεπτική αξία των δημητριακών και των σιτηρών μειώνεται κατακόρυφα μετά τη μόλυνση με μυκοτοξίνες. Η μόλυνση από μύκητες επηρεάζει τόσο τη διατροφική αξία όσο και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφών, και ενέχει τον κίνδυνο τοξίκωσης. Οι βιολογικές επιδράσεις των μυκοτοξινών εξαρτώνται από τις προσλαμβανόμενες ποσότητες, τον αριθμό των τοξινών, τη διάρκεια της έκθεσης σε μυκοτοξίνες και την ευαισθησία των ζώων (Akande και συν., 2006). Επίσης οι μυκοτοξίνες μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα υγείας που είναι ειδικά για κάθε τοξίνη ή να επηρεάσουν το ανοσοποιητικό σύστημα των ζώων, καθιστώντας τα ιδιαίτερα επιρρεπή στις λοιμώξεις. Αυτός είναι ο κύριος λόγος για τη δυσκολία της διάγνωσης των αφλατοξινών (Yiannikouris και Jonany, 2002).

Ο οικονομικός αντίκτυπος της μειωμένης παραγωγικότητας των ζώων, της αυξημένης συχνότητας εμφάνισης νοσημάτων λόγω ανοσοκαταστολής, της βλάβης ζωτικών οργάνων και της παρέμβασης στην αναπαραγωγική τους ικανότητα, είναι πολλές φορές

μεγαλύτερος από αυτόν που προκαλείται από το θάνατο λόγω αφλατοξίκωσης (Akande και συν., 2006). Οι μυκοτοξίνες ασκούν μεγαλύτερη αρνητική επίδραση στην υγεία και την παραγωγικότητα των ζωικών πληθυσμών όταν δρουν συνδυαστικά (Smith και Seddon, 1998).

Μια φόρμουλα για τον παγκόσμιο οικονομικό αντίκτυπο είναι δύσκολο να αναπτυχθεί και, ως εκ τούτου, οι περισσότερες εκθέσεις σχετικά με τις οικονομικές επιπτώσεις αφορούν σε μια μόνο πτυχή της έκθεσης ή μόλυνσης (Hussein και Brasel, 2001).

Έρευνες που έχουν διεξαχθεί σε αναπτυσσόμενες και σε αναπτυγμένες χώρες έχουν δείξει εκτεταμένη μόλυνση από αφλατοξίνες. Μελέτες παρακολούθησης (Placinta και συν., 1999) έδειξαν ότι η μόλυνση των δημητριακών και άλλων τροφών με μυκοτοξίνες του γένους *Fusarium* είναι ένα παγκόσμιο πρόβλημα. Στη Γιουγκοσλαβία, οι μελέτες για τους μυκοτοξιγενείς μύκητες στο γάλα αναφέρουν ότι το 91% των εξετασθέντων δειγμάτων ήταν μολυσμένα (Skrinjar και συν., 1995). Στις ΗΠΑ, σε μια μελέτη που διεξήχθη σε επτά μεσοδυτικές πολιτείες το χρονικό διάστημα 1988-1989, διαπιστώθηκε η παρουσία μυκοτοξινών στο 19,5% των δειγμάτων καλαμποκιού που προσδιορίστηκαν πριν από κάθε περιβαλλοντικό στρες, και στο 24,7% των δειγμάτων μετά την επαγωγή στρες (Russel και συν., 1991). Ο Shane (1994) αναφέρει ότι το 1980, σε οκτώ νοτιοανατολικά κράτη, οι απώλειες που οφείλονταν στην παρουσία αφλατοξινών στο καλαμπόκι ανήλθαν σε 97 εκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ, με επιπλέον 100 εκατομμύρια δολάρια λόγω απώλειας της παραγωγής χοίρων, το σιτηρέσιο των οποίων αποτελούνταν από το μολυσμένο καλαμπόκι.

Στην Ινδία, σε μια μελέτη στην περιοχή του Μπιχάρ (Ranjan και Sinha, 1991), σχεδόν το 51% των 387 δειγμάτων ήταν μολυσμένα με μούχλα. Από τα 139 δείγματα που περιείχαν αφλατοξίνες, στα 133 τα επίπεδα ήταν $> 20 \mu\text{g/kg}$. Σε μια άλλη μελέτη (Phillips και συν., 1996), τα επίπεδα των αφλατοξινών ήταν της τάξεως των $3700 \mu\text{g/kg}$ στην αραχίδα που χρησιμοποιείται ως τροφή για τα ζώα γαλακτοπαραγωγής. Εκτιμάται ότι χάθηκαν 10 εκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ στον τομέα των εξαγωγών της Ινδίας μέσα σε μια δεκαετία· κάτι που οφείλεται στη μόλυνση με αφλατοξίνες (Vasanthi και Bhat, 1998).

Στην Ταϊλάνδη, η αφλατοξίνη B₁ ανιχνεύθηκε σε 23 από τα 25 δείγματα (92%) και ο μέσος όρος ήταν 7,56 ppb. Η ωχρατοξίνη A ανιχνεύθηκε σε 3 από τα 10 δείγματα (30%) στα επίπεδα των 10.48, 11.14 και 12.35 ppb. Η δεοξυνιβαλενόλη ανιχνεύθηκε σε 13 από τα 15 δείγματα (86%) και ο μέσος όρος ήταν 33,77 ppb. Η T-2 τοξίνη ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα (10 δείγματα) και ο μέσος όρος ήταν 6,91 ppb. Η έκταση της μόλυνσης

από αφλατοξίνες καθορίστηκε από 10 δείγματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 3 από τα 10 δείγματα ήταν μολυσμένα με 4 είδη μυκοτοξινών (αφλατοξίνη B₁, ωχρατοξίνη A, δεσοξυनिβαλενόλη και Τοξίνη T-2), και 7 από τα 10 δείγματα ήταν μολυσμένα με 3 είδη μυκοτοξινών (αφλατοξίνη B₁, δεσοξυनिβαλενόλη και Τοξίνη T-2) (Charoenpornsook και Kavisarasai, 2006). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν έναν υψηλό κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία, λόγω της έμμεσης έκθεσης μέσω του κρέατος και άλλων προϊόντων που προέρχονται από ζώα που καταναλώνουν μολυσμένες ζωοτροφές.

Τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με τις οικονομικές επιπτώσεις των μυκοτοξινών στην Αφρική είναι, ωστόσο, ελλιπή. Στη Νιγηρία, η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) κατέστρεψε τρόφιμα μολυσμένα με αφλατοξίνες αξίας άνω των 200.000 δολαρίων ΗΠΑ.

Το 1997, η Ευρωπαϊκή Ένωση πρότεινε την εναρμόνιση των μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων αφλατοξινών σε ορισμένα τρόφιμα. Το πρότυπο κυμαινόταν από 4 ppb στα δημητριακά, εδώδιμους καρπούς και αποξηραμένα φρούτα, έως 10 ppb στους ξηρούς καρπούς που υποβάλλονται σε περαιτέρω επεξεργασία. Το καθολικό πρότυπο του Codex Alimentarius είναι περίπου 9 ppb.

Η εφαρμογή των επιπέδων αυτών επηρέασε αρνητικά τις αφρικανικές εξαγωγές δημητριακών, αποξηραμένων φρούτων και βρώσιμων ξηρών καρπών στην Ευρώπη. Η απώλεια των εσόδων από τις εξαγωγές σε χώρες της Αφρικής υπολογίζεται σε 400 εκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ.

Το DFID (Department For International Development - Ηνωμένο Βασίλειο) αξιολόγησε το κόστος της επιτήρησης και παρακολούθησης τροφίμων για τις αφλατοξίνες για ένα εργαστήριο, στο ύψος των 125.000 δολαρίων ΗΠΑ ετησίως.

Μια μελέτη αποκάλυψε ότι οι εφαρμογές των κανονισμών της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τις αφλατοξίνες κόστισαν σε εννέα χώρες της Αφρικής 750 εκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ ετησίως στις εξαγωγές δημητριακών, αποξηραμένων φρούτων και ξηρών καρπών.

Είναι αναγκαία, λοιπόν, η ανάπτυξη δυνατοτήτων που παρέχουν στις εθνικές αρχές τα εργαλεία, ώστε να αξιολογήσουν τις απώλειες που οφείλονται σε αφλατοξίνες, καθώς και των επιπτώσεων των αφλατοξινών στο εμπόριο, τη φτώχεια, και την υγεία, τόσο των ζώων, όσο και του ανθρώπου. Είναι επίσης απαραίτητη η κατάρτιση ερευνητών και τεχνικών εργαστηρίων πάνω στην ασφάλεια των τροφίμων και τον ποιοτικό έλεγχο.

9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Είναι σαφές ότι οι μυκοτοξίνες αποτελούν, ολοένα και περισσότερο, αντικείμενο ενδιαφέροντος για όλους εκείνους που εμπλέκονται στην παρασκευή των ζωοτροφών, στη γεωργία και την παραγωγή τροφίμων. Είναι επιβλαβείς για τα ζώα, και μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τις επιδόσεις και την παραγωγικότητά τους. Επειδή υπάρχει ένα ευρύ φάσμα αφλατοξινών με διαφορετικές χημικές δομές, μια απλή προσέγγιση δεν μπορεί να λύσει αποτελεσματικά το πρόβλημα. Η ποιότητα των πρώτων υλών, η πρόληψη της εμφάνισης των μυκοτοξινών, ο έλεγχος και οι δοκιμές των συστημάτων, αποτελούν πολύ σημαντικούς παράγοντες για τη μείωση της έκθεσης των ανθρώπων και των ζώων σε μυκοτοξίνες.

Λαμβάνοντας υπόψη όλες τις γνώσεις σχετικά με τη χημική δομή, τους τρόπους δράσης, και τα τοξικά αποτελέσματα των μυκοτοξινών σε ανθρώπους και ζώα, και το αυξημένο κόστος της παραγωγής, οι λύσεις στα προβλήματα που αφορούν τις μυκοτοξίνες εξακολουθούν να είναι λίγες και ανεπαρκείς. Οι ορθές γεωπονικές πρακτικές μπορεί να είναι χρήσιμες, αλλά αν δεν περιλαμβάνουν άρδευση, έχουν μικρή επίδραση ακόμα και στη μέτρια ξηρασία. Η μείωση της ευπάθειας των καλλιεργειών στις μυκοτοξίνες και οι ανταγωνιστικοί μύκητες είναι οι πιο ελπιδοφόρες μόνιμες λύσεις που έχουν τη δυνατότητα να μειώσουν σημαντικά το κόστος της παραγωγής. Η κατάλληλη δειγματοληψία και ο έλεγχος, είναι επίσης σημαντικά για τη μείωση του κόστους, με παράλληλη εξασφάλιση ότι πληρούνται οι κατευθυντήριες γραμμές της ΕΕ.

Μια σειρά από ζητήματα για την προώθηση των ορθών πρακτικών καλλιέργειας και συγκομιδής περιλαμβάνει:

- (α) Φυτική αναπαραγωγή για την επιλογή ανθεκτικών ποικιλιών.
- (β) Προώθηση των μεθόδων ταχείας ξήρανσης.
- (γ) Αξιολόγηση και προσαρμογή των τεχνολογιών αποθήκευσης στις τοπικές συνθήκες, για παράδειγμα, αποθήκες σιτηρών με στεγνωτήρες και ταχείς ανιχνευτές υγρασίας.
- (δ) Προώθηση των ορθών παραδοσιακών πρακτικών, όπως η διαλογή και η χρήση φυσικών συντηρητικών παραγόντων.
- (ε) Αξιολόγηση και προώθηση των τεχνολογιών συσκευασίας που μειώνουν τη μυκητιακή μόλυνση.

Τα ακόλουθα προτείνονται για την ευαισθητοποίηση όλων των ενδιαφερόμενων και το ευρύ κοινό:

(α) Η συνηγορία για τη συμμετοχή όλων των ενδιαφερόμενων (συμπεριλαμβανομένων των δυνητικών χορηγών), και η παραγωγή πολιτικής βούλησης για την αντιμετώπιση του προβλήματος.

(β) Η εκπαίδευση του κοινού, αγροτών και καταναλωτών σχετικά με τους κινδύνους που συνδέονται με την κατανάλωση μολυσμένων από αφλατοξίνες τροφίμων, και η προώθηση των ορθών γεωργικών πρακτικών.

(γ) Ο συντονισμός και η συνεργασία των φορέων υγείας και γεωργίας, ιδιαίτερα στον τομέα της εκπαίδευσης.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) θα πρέπει να μεριμνήσει:

(α) για την αναγνώριση από όλες τις εθνικές κυβερνήσεις της μόλυνσης των τροφίμων με αφλατοξίνες, ως μείζον ζήτημα της δημόσιας υγείας,

(β) για την πρόληψη και βελτίωση της διαχείρισης των αφλατοξικώνσεων,

(γ) για την ενσωμάτωση, στην υγεία, στη γεωργία και στους τομείς κοινωνικής ανάπτυξης, πολιτικών για την πρόληψη και τον έλεγχο των αφλατοξινών και άλλων μυκοτοξινών,

(δ) για την πρόσβαση στα πρότυπα των μυκοτοξινών και στην ταξινόμηση των αφλατοξινών, ως εργαλεία κατά του περιορισμού των μεταφορών και της βιοτρομοκρατίας,

(ε) για τη δημιουργία μιας συμβουλευτικής ομάδας για την ασφάλεια των τροφίμων,

(στ) για την παροχή τεχνικών συμβουλών, με αντικείμενο τη δημιουργία συστημάτων έγκαιρης προειδοποίησης για την οξεία και χρόνια αφλατοξίκωση,

(ζ) για την προώθηση της εναρμόνισης, της εφαρμογής και επιβολής των προτύπων,

(η) για την προώθηση της έρευνας, σχετικά με τις επιπτώσεις των αφλατοξινών στην υγεία,

(θ) για τη βελτίωση της διαχείρισης της οξείας αφλατοξίκωσης, με τη δημιουργία ενός εγχειριδίου για την αναθεώρηση των υφιστάμενων κατευθυντήριων γραμμών σχετικά με την ολοκληρωμένη επιτήρηση της νόσου, και την ολοκληρωμένη διαχείρισή της κατά την παιδική ηλικία, αλλά και στους ενήλικες.

Τα συμπεράσματα της παρούσας ανασκόπησης - περιληπτικά - είναι τα ακόλουθα:

1) Η μόλυνση των τροφίμων με αφλατοξίνες επηρεάζει τον άνθρωπο και τους πόρους διαβίωσης φυτικής και ζωικής παραγωγής. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τους υποσιτιζόμενους φτωχούς ανθρώπους ανά τον κόσμο, που δεν έχουν βαθμούς ελευθερίας στην επιλογή των τροφίμων που καταναλώνουν.

- 2) Η οξεία αφλατοξίκωση είναι μια σημαντική αιτία ηπατικής βλάβης, καθώς η αφλατοξίνη B₁ είναι ένα «ομάδας 1» καρκινογόνο του ήπατος για τον άνθρωπο.
- 3) Η έκθεση σε αφλατοξίνες είναι ένας αιτιολογικός παράγοντας του παιδικού νανισμού, νευρολογικών διαταραχών, ανοσοκαταστολής και παιδικής θνησιμότητας.
- 4) Δεδομένου ότι η έκθεση σε αφλατοξίνες οδηγεί σε ανοσοκαταστολή, θα μπορούσε να αλληλεπιδρά με τον ιό HIV / AIDS και άλλες λοιμώξεις.
- 5) Τέλος, η έκθεση σε αφλατοξίνες είναι ένα πρόβλημα υγείας με ρίζες σε όλη την τροφική αλυσίδα και, συνεπώς, απαιτεί μια διεπιστημονική προσέγγιση για την ανάλυση, δράση και λύσεις.

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abbas, H.K., Reddy, K.R.N., Salleh, B., Saad, B., Abel, C.A., and Shier, W.T. (2010) An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Reviews*, 29: 3-26.
2. Abbas, H.K., Wilkinson J.R., Zablotowicz R.M., Accinelli C., Abel C.A., Bruns H.A., and Weaver M.A. (2009) Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews*, 28(2–3): 142–153.
3. Abdin M.Z., Ahmad M.M. and Javed S. (2010) Advances in molecular detection of *Aspergillus*: an update. *Archives of microbiology*, 192(6): 409-25.
4. Abdulkadar, A.H.W., Al-Ali, A.A., Al-Kildi, A.M., and Al-Jedah, J.H. (2004) Mycotoxins in food products available in Qatar. *Food Control*, 15: 543-548
5. Abeywickrama, K., and Bean, G.A. (1991) Toxigenic *Aspergillus-Flavus* and Aflatoxins in Sri-Lankan Medicinal Plant-Material. *Mycopathologia*, 113: 187-190.
6. Abousadi, M.A., Rowghani, E., and Honarmand, M.E. (2007) The efficacy of various additives to reduce the toxicity of aflatoxin B-1 in broiler chicks. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 8: 144-150.
7. Adinarayanaiah, G.L., Nanjiah, R.D., Keshavamurthy, B.S. (1973) Effect of aflatoxin on antibody production to *Salmonella pullorum* antigen in chicks. *Indian Vet J*, 2: 297.
8. Ahmed, N.E., Farag, M.M., Soliman, K.M., Abdel-Samed, A.K.M., Naguib, Kh.M. (2007) Evaluation of methods used to determine ochratoxin a in coffee beans. *J. Agric. Food Chem*, 55: 9576–9580.
9. Ahn, J.H., Nam, I.S., and Garnsworthy, P.C. (2009) Effects of Freeze-dried Citrus Peel on Feed Preservation, Aflatoxin Contamination and In vitro Ruminal Fermentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22: 674-680.
10. Akande, K.E., M.M. Abubakar, T.A. Adegbola and S.E. Bogoro, (2006). Nutritional and health implications of mycotoxins in animal feeds: A review. *Pak. J. Nutr.*, 5: 398-403.
11. Akbas, M.Y., and Ozdemir, M. (2006) Effect of different ozone treatments on aflatoxin degradation and physicochemical properties of pistachios. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 2099-2104.

12. Alemu, T., Birhanu, G., Azerefgne, F., and Skinnnes, H. (2008) Evidence for mycotoxin contamination of maize in Southern Ethiopia: The need for further multidisciplinary research. *Cereal Research Communications*, 36: 337- 339.
13. Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. and Blackwell, M. (1996) *Introductory Mycology*, 4th ed., John Wiley and Sons, New York.
14. Ali, N., Hashim, N.H., Saad, B., Safan, K., Nakajima, M., and Yoshizawa, T. (2005) Evaluation of a method to determine the natural occurrence of aflatoxins in commercial traditional herbal medicines from Malaysia and Indonesia. *Food and Chemical Toxicology*, 43: 1763-1772.
15. Allcroft, R. (1965) Aspects of aflatoxicosis in farm animals. In: Wogan GN (ed) *Mycotoxins in Foodstuffs: Proceedings of MIT Symposium*, March 18-19, 1964. Cambridge, MA, pp 153-162.
16. Almeda, S., Arce, L., Valcarcel, M. (2008) Combined use of supported liquid membrane and solid-phase extraction to enhance selectivity and sensitivity in capillary electrophoresis for the determination of ochratoxin A in wine. *Electrophoresis*, 29: 1573–1581.
17. Amla, J., Kawala, C.S., Fopalakrishna, C.S., Jayaraj, A.P., Sreehivasamartng, A. and Parpia, H.A.B. (1971) Cirrhosis in children from peanut meal contaminated by aflatoxin. *Am. J. Clin. Nutr*, 24: 609-614.
18. Anderson, H.W., Nehring, E.W. and Wichser, W.R. (1975) Aflatoxin contamination of corn in the field, *J Agric Food Chem*, 23: 775–782.
19. Andrellos, P.J. and Reid, G.B. (1964) Confirmatory tests for aflatoxin B. *J. Assoc. Offic. Ag. Chemists*, 47: 801-803.
20. Angle, J.S. (1987) Aflatoxin and aflatoxin-producing fungi in soil, in *Aflatoxin in Maize*, Zuber, M.S., Lillehoj, E.B., and Renfro, B.L., Eds., CIMMYT, Mexico: 152–163.
21. Ansher, S.S., Dolan, P., and Bueding, E. (1986) Biochemical effects of dithiolthiones. *Food Chem. Toxicol.* 24: 405–415.
22. Aresta, A., Vatinno, R., Palmisano, F., Zambonin, C.G. (2006) Determination of Ochratoxin A in wine at sub ng/mL levels by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, 1115: 196–201.

23. Armbrrecht, B.H., Wiseman, H.G., Shalkop, W.T. (1972) Swine aflatoxicosis II. The chronic response in brood sows fed sublethal amounts of aflatoxin and the reaction in their piglets. *Environ Phys Biochem* 2:77-85.
24. Arst, H.N. and Penalva, M.A. (2003) pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends Genet*, 19: 224–231.
25. Arzandeh, S. and Jinap, S. (2011) Effect of initial aflatoxin concentration, heating time and roasting temperature on aflatoxin reduction in contaminated peanuts and process optimisation using response surface modelling. *International Journal of Food Science and Technology*, 46: 485-491.
26. Asao, T., Buche, G., Abdel Kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., Wogan, G.N. (1965) The structures of Aflatoxin BI and G I. In: Wogan GH (cd) *Mycotoxins in Foodstuffs: Proceedings of MIT Symposium*, March 18-19, 1964. MIT Press, Cambridge, MA, pp 265-273.
27. Asao, T.G.; Buchi, M.M, Abdel Kader, S.B, Chang, E.L, Wick, and Wogan G.N. (1963) Aflatoxins B and G. *J. Am. Chem. So*, 85: 1706-1707.
28. Ashworth, L.J., McMeans, J.L. and Brown, C.M. (1969) Infection of cotton by *Aspergillus flavus*: Epidemiology of the disease, *J Stored Prod Res*, 5: 193–202.
29. Ashworth, L.J., Rice, R.E., McMeans, J.L. and Brown, C.M. (1971) The relationship of insects to infection of cotton bolls by *Aspergillus flavus*, *Phytopathology*, 61: 488–493.
30. Assiz-Baumgartner, E., Lindblade, K., Gieseke, K., Rogers, H.S., Kieszak, S., Njapan, H., Schleicher, R., McCoy, L.F., Misore, A., DeCock, K., Rubin, C. and Slutsker, L. (2005) Case-Control Study of an Acute Aflatoxicosis Outbreak, Kenya,(2004). *Environmental Health Perspectives*, 113: 1779-1783.
31. Autrup, J.L., Schmidt, J., Seremet, T. and Autrup, H. (1993) Exposure to aflatoxin B in animal feed production plant workers. *Environ. Health Perspect.*, 99, 195–197.
32. Bacaloni, A., Cavaliere, C., Cucci, F., Foglia, P., et al., (2008) Determination of aflatoxins in hazelnuts by various sample preparation methods and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1179: 182–189.
33. Bamba, R., and Sumbali, G. (2005) Co-occurrence of aflatoxin B(1) and cyclopiazonic acid in sour lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) during post-harvest pathogenesis by *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia*, 159: 407-411.

34. Bandyopadhyay R, Kumar M, Leslie JF. (2007) Relative severity of aflatoxin contamination of cereal crops in West Africa. *Food Addit Contam.* 24: 1109-1114.
35. Barbieri G, Bergamini C, Ori E and Pesca P. (1994) Aflatoxin M1 in parmesan cheese: HPLC determination. *Journal of Food Science*, 59: 1313–1331.
36. Barbour, G.W., Farran, M.T., Usayran, N., and Daghir, N.J. (2008) Review of poultry production and the physical and chemical characteristics of imported corn and soybean meal in major feed operations in Lebanon. *Worlds Poultry Science Journal*, 64: 177-185.
37. Barnes, S.E., Dola, T.P., Bennett, J.W. and Bhatnagar, D. (1994) Synthesis of sterigmatocystin on a chemically defined medium by species of *Aspergillus* and *Chaetomium*, *Mycopathologia*, 125: 173–178.
38. Barton, H.A., Cogliano, V.J., Flowers, L., Valcovic, L., Serzer, R.W. and Woodruff, T.J., (2005) Assessing susceptibility from early-life exposure to carcinogens. *Environ. Health Perspect.*, 113: 1125–1133.
39. Bastianello, S.S.; Nesbit, J.W.; Willians, M.C. and Lange, A.L. (1987): "Pathological findings in a natural outbreak of aflatoxicosis in dogs." *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 54: 635-640.
40. Battacone, G.; Nudda, A.; Cannas, A.; Cappio Borlino, A.; Bomboi, G.; and Pulina, G. (2003) Excretion of aflatoxin M1 in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B1. *Journal of Dairy Science*, 86: 2667-2675.
41. Bayman, P. and Cotty, P.J. (1991) Vegetative compatibility and genetic diversity in the *Aspergillus flavus* population of a single field, *Can. J. Bot. (Revue Canadienne De Botanique)*: 69(8): 1707–1711.
42. Bayman, P. and Cotty, P.J. (1993) Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology, *Can. J. Bot. Revue Canadienne De Botanique*, 71(1): 23–31.
43. Becroft, D.M.O. and Webster, D.R. (1972) Aflatoxins and Reye's disease. *Brit. Med. J*, 4: 117.
44. Belay, E.D., Bresee, J.S., Holman, R.C., Khan, A.S., Shahriari, A., and Schonberger, L.B. (1999) Reye's syndrome in the United States from 1981 through 1997, *The New England Journal of Medicine*, 340(18): 1377-1382.

45. Bennett J.W., Kale S, Yu J. (2007). Aflatoxins: Background, Toxicology and Molecular Biology. From Infectious Disease: Foodborne Diseases Edited by S.Simjee. Human Press Inc., Totowa, NJ.: 355-374.
46. Bennett, J.W. (2010) An overview of the genus *Aspergillus*, in *Aspergillus: Molecular biology and genomics*, Masayuki Machida and Katsuya Gomi Eds., Ch., 1: 1-17.
47. Berberich, S. (1995) Is cotton containing the bollguard gene safe? *Oil Mill Gazetteer*, 101, 18–19.
48. Berthiller, F., Sulyok, M., Krska, R., Schuhmacher, R. (2007) Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *Intern. J. Food Microbiol.*, 119: 33–37.
49. Bhat, R., Rai, R. V., and Karim, A. A. (2010) Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9: 57-81.
50. Bhatnagar D. and McCormick S.P. (1988) The inhibitory effect of neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts on aflatoxin synthesis in *Aspergillus parasiticus*, *J Am Oil Chem Soc*, 65: 1166–1168.
51. Bhatnagar, D., Cary, J.W., Ehrlich, K., Yu, J., Cleveland, T.E. (2006) Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia*, 162(3): 155-166.
52. Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. and Payne, G.A. (2000) *Aspergillus flavus*, in *Encyclopedia of Food Microbiology*, Robinson, R.K., Batt, C.A., and Patel, P.D., Eds., Academic Press, London: 72–79.
53. Bhatnagar, D., Ehrlich, K.C. and Cleveland, T.E. (2003) Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 61(2): 83–93.
54. Bittencourt, A.B.F., Oliveira, C.A.F., Dilkin, P., and Correa, B. (2005) Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in Sao Paulo, Brazil. *Food Control*, 16: 117-120.
55. Blankenship, P.D., Cole, R.J., Sanders, T.H. and Hill, R.A. (1984) Effect of geocarposphere temperature on pre-harvest colonization of drought-stressed peanuts by *Aspergillus flavus* and subsequent aflatoxin contamination, *Mycopathologia*, 85: 69–74.

56. Blesa, J., Berrada, H., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. (2004) Rapid determination of ochratoxin A in cereals and cereal products by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1046: 127–131.
57. Blesa, J., Soriano, J.M., Molto, J.C., and Manes, J. (2004) Limited survey for the presence of aflatoxins in foods from local markets and supermarkets in Valencia, Spain. *Food Additives and Contaminants*, 21: 165-171.
58. Blesa, J., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Marín, R., Mañes, J. (2003) Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1011: 49–54.
59. Blount, W.P. (1960) A new turkey disease problem in England. *Brit Oil and Cake Mills, Ltd. Quar Poult Bull* 27: 1-3.
60. Blount, W.P. (1961) Turkey 'X' disease. *J. Br. Turkey Fed.* 9: 55–58.
61. Bock, C.H. and Cotty, P.J. (1999) The relationship of gin date to aflatoxin contamination of cottonseed in Arizona. *Plant Disease*, 83: 279–285.
62. Bock, C.H., Mackey, B., Cotty, P.J. (2004) Population dynamics of *Aspergillus flavus* in the air of an intensively cultivated region of south-west Arizona. *Plant Pathology*, 53: 422–433.
63. Bodine, A.B. and Mertens, D.R. (1983) Toxicology, metabolism, and physiological effects of aflatoxins in the bovine. In: Diener UL, Asquith RL, Dickens JW (eds) *Aflatoxin and Aspergillus flavus in com.* Alabama Agric Exp Sta, Auburn Univ, AL, pp 46-50.
64. Bok, J.W. and Keller, N.P. (2004) LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic Cell*, 3(2): 527–535.
65. Boller, R.A. and Schroeder, H.W. (1974) Influence of temperature on production of aflatoxin in rice by *Aspergillus parasiticus*, *Phytopathology*, 64: 283.
66. Bommakanti, A.S. and Waliyar, F. (2007) "Importance of aflatoxins in human and livestock health" <http://www.icrisat.org/aflatoxin/health.asp>
67. Bourais, I., Amine, A., Venanzi, M., Micheli, L., et al., (2006) Development and application of a two-phase clean-up system in food samples prior to fluorescence analysis of aflatoxins, *Microchim. Acta*, 153: 101 –108.
68. Boutrif, E. and C. Canet. (1998). Mycotoxin prevention and control: FAO programmes. *Revue Med. Vet.* 149: 681-694.

69. Bowen, K.L. and Mack, T.P. (1993) Relationship of damage from the lesser cornstalk borer to *Aspergillus flavus* contamination in peanuts, *J. Entomol. Sci.*, 28: 29–42.
70. Boyd, M.L., Cotty, P.J. (2001) *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination of leguminous trees of the Sonoran Desert in Arizona. *Phytopathology*, 91, 913–919.
71. Breinholt, V., Hendricks, J., Pereira, C., Arbogast, D., and Bailey, G. (1995a) Dietary chlorophyllin is a potent inhibitor of aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis in rainbow trout. *Cancer Res.* 55: 57–62.
72. Breinholt, V., Schimerlik, M., Dashwood, R., and Bailey, G. (1995b) Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis against aflatoxin B1: complex formation with the carcinogen. *Chem. Res. Toxicol.* 8: 506–514.
73. Brera C, Debegnach F, Minardi V, Pannunzi E, De Santis B, Miraglia M (2007) “Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin B1 in corn samples: interlaboratory study *J AOAC Int* 90(3):765-772.
74. Brera, C., Grossi, S., De Santis, B., Miraglia, M. (2003) Automated HPLC method for the determination of Ochratoxin A in wine samples. *J. Liq. Chrom. Rel. Techn.*, 26: 119–133.
75. Brera, C., R. Caputi, M. Miraglia, I. Iavicoli, A. Salnero and G. Carelli. (2002). Exposure assessment to mycotoxins in workplaces. Aflatoxins and ochratoxin A occurrence in airborne dusts and human sera. *Microchem J* 73: 167-173.
76. Briggs, D.M. Wyatt, R.D. and Hamilton, P.B. (1974): "The effect of dietary aflatoxin on semen characteristics of mature broiler breeder males." *Poult. Sci.*, 53: 2115-2119.
77. Brown, D.W., Yu, J.H., Kelkar, H.S., Fernandes, M. and Nesbitt, T.C. (1996) Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 1418–1422.
78. Brown, M.P., Brown-Jenco, C.S., and Payne, G.A. (1999) Genetic and molecular analysis of aflatoxin biosynthesis, *Fungal Genet. Biol.*, 26(2): 81–98.
79. Bruce RD. (1990) Risk assessment for aflatoxin: II. Implications of human epidemiology data. *Risk Anal.* 10: 561-569.
80. Bryden, W.I. (1991) Occurrence and biological effects of cyclopiazonic acid, in *Emerging Food Safety Problems Resulting from Microbial Contamination: Proceedings of the Seventh International Symposium on Toxic Microorganisms*, Mise, K. and Richard, J.L., Eds., UJNR, Tokyo: 127–147.

81. Buchi, G. and Rae, I.D. (1969) The structure and chemistry of the aflatoxins, in Aflatoxins, Goldblatt, L.A., Ed., Academic Press, New York, 55.
82. Bueding, E., Dolan, P., and Leroy, J. P. (1982) The antischistosomal activity of oltipraz. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 37: 293–303.
83. Bullerman, L.B. (1979) Significance of mycotoxins to food safety and human health, J. Food Prot., 42: 65.
84. Bullerman, L.B. and Bianchini, A. (2007) Stability of mycotoxins during food processing. International Journal of Food Microbiology, 119: 140-146.
85. Bunger, J., Westphal, G., Monnich, A., Hinnendahl, B., Hallier, E., and Muller, M. (2004) Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. Toxicology, 202(3): 199-211.
86. Burow, G.B., Nesbitt, T.C., Dunlap, J.D., and Keller N.P. (1997) Seed lipoxygenase products modulate *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis, Mol. Plant Microbe. Interactions, 10: 380-387.
87. Busby, W.F. Jr, Wogan, G.N. (1981) Aflatoxins. In: Shank RC (ed) Mycotoxins and *N-Nitroso* Compounds. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 3-27.
88. Butchko, R.A.E., Adams, T.H. and Keller, N.P. (1999) *Aspergillus nidulans* mutants defective in *stc* gene cluster regulation Genetics, 153: 715–720.
89. Butler, F.C. (1947) Ear, cob, and grain rots of maize, Agri Gaz, New South Wales, 58.
90. Butler, W.H., (1965) Liver Injury and Aflatoxin. In: Wogan GH (ed) Mycotoxins in Foodstuffs, Proceedings of MIT Symposium, March 18-19, 1964, MIT Press, Cambridge, MA, pp 175-186.
91. Caloni F. and Cortinovis C. (2010) Toxicological effects of aflatoxins in horses. The Veterinary Journal, 188(3): 270-3.
92. Calvo A.M., Wilson R.A., Bok J.W., Keller N.P. (2002) Relationship between secondary metabolism and fungal development, Microbiol Mol Biol Rev, 66(3): 447–459.
93. Calvo, A.M., Bok, J.W., Brooks, W. and Keller, N.P. (2004) *veA* is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. Appl Environ Microbiol, 70(8): 4733–4739.
94. Calvo, A.M., Gardner, H.W., Keller, N.P. (2001) Genetic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*, J Biol Chem, 276(28): 25766–25774.

95. Calvo, A.M., Hinze, L.L., Gardner, H.W., Keller, N.P. (1999) Sporogenic effect of polyunsaturated fatty acids on development of *Aspergillus* spp, *Appl Environ Microbiol*, 65: 3668.
96. Cardwell, K.F. and Cotty, P.J. (2002) Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* among field soils from the four agroecological zones of the Republic of Benin, West Africa, *Plant Dis.*, 86(4): 434–439.
97. Carnaghan, R.B.A. (1965) Hepatic tumors in ducks fed a low level of toxic groundnut meal. *Nature* 203: 308.
98. Cary J.W., Montalbano B.G., and Ehrlich K.C. (2000) Promoter elements involved in the expression of the *Aspergillus parasiticus* aflatoxin biosynthesis pathway gene *avnA*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 91377, 1-6.
99. CAST (1989) Mycotoxin, Economic and Health Risks. Task Force Rept 116.
100. Cavaliere, C., Foglia, P., Guarino, C., Marzioni, F., et al., (2006) Aflatoxin M1 determination in cheese by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1135: 135–141.
101. CCFAC (Codex Committee on Food Additives and Contaminants) (1999) Micotoxinas presentes en Alimentos y Piensos. Observaciones sobre el proyecto de nivel máximo para la aflatoxina M1 en la leche (Tema 16 del programa) <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/x7137s/x7137s0n.htm>
102. CCFAC (Codex Committee on Food Additives and Contaminants) (2000) Micotoxinas en los Alimentos y los Piensos. Observaciones sobre el proyecto de nivel máximo para la aflatoxina M1 en la leche (Tema 15 del programa) <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/y0474s/y0474s0m.htm>
103. CCFAC (Codex Committee on Food Additives and Contaminants) (2001) La Comisión Europea; Seguridad Alimentaria. Observaciones de la Comunidad Europea para la Comisión del Codex Alimentarius, 24º Reunión. 2-7 de Julio de 2001, Ginebra, Suiza. “Proyecto del nivel máximo para la aflatoxina M1 en la leche” (ALINORM 01/12 A-*apendice X*)”.
104. Cervino, C., Asam, S., Knopp, D., Rychlik, M., Niessner, R. (2008) Use of isotope-labeled Aflatoxins for LC-MS/MS stable isotope dilution analysis of foods. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 1873–1879.
105. Chaffee, V.W.; Edds, G.T.; Himes, J.A. and Neal, F.C. (1969): "Aflatoxicosis in dogs" *Am. J. Vet. Res.*, 30: 1737-1749.

106. Chang P.K., Yu J., Ehrlich K.C., Boue S.M., Montalbano B.G., Bhatnagar D., and Cleveland T.E. (2000) Disruption of the aflatoxin biosynthetic gene *adh A* in *Aspergillus parasiticus* leads to the accumulation of 5'-hydroxyaverantin. Annual Meeting of the American Society of Microbiology, Los Angeles, CA, 57.
107. Chang, P.K. (2003) The *Aspergillus parasiticus* protein aflJ interacts with the aflatoxin pathway-specific regulator aflR. *Mol General Genet*, 268(6): 711–719.
108. Chang, P.K., Yu, J., Bhatnagar, D. and Cleveland, T.E. (1999) Repressor-AFLR interaction modulates aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*, 147: 105–112.
109. Chang, P.K., Yu, J., Bhatnagar, D., and Cleveland, T.E. (2000) Characterization of the *Aspergillus parasiticus* major nitrogen regulatory gene, *are A*. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1491: 263-266.
110. Charoenpornsook, K. and P. Kavisarasai, (2006). Mycotoxins in animal feedstuff of Thailand. *KMILT Sci. Tech. J.*, 6: 25-28.
111. Chaves-Carballo, E., Ellefson, R.D. and Gomez, M.R. (1976) An aflatoxin in the liver of a patient with Reye-Johnson syndrome. *Mayo Clin. Rroc*, 51: 48-50.
112. Chen, C.-Y., Li, W.-J., Peng, K.-Y., (2005) Determination of aflatoxin M1 in milk and milk powder using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, 53: 8474 – 8480.
113. Cheng, B.C., Wan, C.X., Yang, S.L., Xu, H.Y., Wei, H., Liu, J.S., Tian, W.H., and Zeng, M. (2010) Detoxification of Deoxynivalenol by *Bacillus* Strains. *Journal of Food Safety*, 30: 599-614.
114. Chiavaro E, Dall'Asta C, Galaverna G, Biancardi A, Gambarelli E, Dossena A, [Marchelli R](#). (2001) New reversed-phase liquid chromatographic method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. [J Chromatogr A](#), 937(1-2): 31-40.
115. Chiou, C.H., Miller, M., Wilson, D.L., Trail, F. and Linz, J.E. (2002) Chromosomal location plays a role in regulation of aflatoxin gene expression in *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol*, 68: 306–315.
116. Cho Y.J., Chun H.S., Kim C.J., Kim C.T., Hong J.Y. (2005) Detection of fumonisin B-1 by a batch type surface plasmon resonance biosensor. *Food Sci Biotechnol* 14: 698–699.

117. Christensen, M. (1981) A synoptic key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group, *Mycologia*, 73(6): 1056–1084.
Chromatogr., 581: 119-128.
118. Chu F.S., Lee, R.C. Trucksess M.W., Park D.L., (1988) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay of cleanup for thin-layer chromatography of aflatoxin B1 in corn, peanuts, and peanut butter. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71: 953-956.
119. Chuang, S., La Vecchia, C., and Boffetta, P. (2009) Liver cancer: Descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection, *Cancer Letters*, 286: 9-14.
120. Chun H.S., Choi E.H., Chang H.J., Choi S.W., Eremin S.A. (2009) A fluorescence polarization immunoassay for the detection of zearalenone in corn. *Anal Chim Acta* 639: 83–89.
121. Chun, H.S., Kim, H.J., Ok, H.E., Hwang, J.B., and Chung, D.H. (2007) Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. *Food Chemistry*, 102: 385-391.
122. Ciegler A., Lillehoj E.B., Peterson R.E. and Hall H.H. (1966) Microbial detoxification of aflatoxin. *Appl. Microbiol.* 14, 934.
123. Cole, R.J. and Cox, R.H. (1981) *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, New York, Academic Press: 1-66.
124. Cole, R.J., Dorner J.W., Springer P., and Cox R.H. (1981) Indole metabolites from a strain of *Aspergillus flavus*. *J. Agric. Food Chem.* 29: 293-295.
125. Cole, R.J., Dorner, J.W. and Holbrook, C.C. (1995) Advances in mycotoxin elimination and resistance, in Pattee, H.E. and Stalker, H.T., Eds., *Advances in Peanut Science*, American Peanut Research and Education Society, Stillwater, Oklahoma: 456-474.
126. Cole, R.J., Hill, R.A., Blankenship, P.D. and Sanders, T.H. (1986) Color mutants of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in a study of preharvest invasion of peanuts, *Appl Environ Microbiol*, 53: 1128–1131.
127. Cole, R.J., Hill, R.A., Blankenship, P.D., Sanders, T.H. and Garren, K.H. (1982) Influence of irrigation and drought stress on invasion by *Aspergillus flavus* of corn kernels and peanut pods, *Dev. Ind. Microbiol.*, 23: 229–236.
128. Coley-Smith, J.R. and Cooke, R.C. (1971) Survival and germination of fungal sclerotia, *Ann. Rev. Phytopathol.*, 9: 65–92.

129. Cook, W.O., Richard, J.L., Osweiler, G.D., Trampel, D.W. (1986) Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: Rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxin BI and MI, *Am J Vet Res* 47: 1817-1825.
130. Cook, W.O., Van Alstine, W.G., Osweiler, G.D. (1989) Aflatoxins in Iowa swine: Eight cases (1983-1985) *JAVMA* 194:554-558.
131. Cornea, C.P., Ciuca, M., Voaides, C., Gagi, V., and Pop, A. (2011) Incidence of fungal contamination in a Romanian bakery: a molecular approach. *Romanian Biotechnological Letters*, 16: 5863-5871, 1224-5984.
132. Corneli, S., Maragos, C.M. (1998) Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence: Method for the mycotoxin ochratoxin A. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3162–3165.
133. Cotty, P.J. (1989) Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology*, 79: 808–814.
134. Cotty, P.J. (1990) Effect of atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* on aflatoxin contamination of developing cottonseed, *Plant Dis.*, 74: 233–235.
135. Cotty, P.J. (1991) Effect of harvest date on aflatoxin contamination of cottonseed. *Plant Disease*, 75: 312–314.
136. Cotty, P.J. (1994) Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cottonseed, *Phytopathology*, 84: 1270–1277.
137. Cotty, P.J. (1997) Aflatoxin-producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing areas in the United States. *Mycological Research*, 101: 698–704.
138. Cotty, P.J. (2001) Cottonseed losses and mycotoxins. In: Kirkpatrick, T.L., Rothrock, C.S. (Eds.): *Compendium of Cotton Diseases*. The American Phytopathological Society, Minnesota: 9–13.
139. Cotty, P.J. and Lee, L.S. (1989) Aflatoxin contamination of cottonseed: comparison of pink bollworm damaged and undamaged bolls. *Tropical Science*, 29, 273–277.
140. Cotty, P.J., Bayman, P., Egel, D.S., Elias, K.S. (1994) Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. In: Powel, K.A., Renwick, A., Peverdy, J.F. (Eds.): *The Genus Aspergillus: from taxonomy and genetics to industrial application*. Plenum Press, New York, NY: 1–27.

141. Cotty, P.J., Bock, C., Howell, D.R., Tellez, A. (1997) Aflatoxin contamination of commercially grown transgenic Bt cottonseed. *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference*, 1: 108–110.
142. Cotty, P.J., Cardwell, K.F. (1999) Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2264–2266.
143. Cysewski, S.J., Pier, A.C., Engstrom, G.W., Richard, J.L., Dougherty, R.W., Thurston, J.R. (1968) Chemical pathologic features of acute aflatoxicosis of swine. *Am J Vet Res* 29: 1577-1590.
144. D' Ovidio, K., Trucksess, M., Weaver, C., Horn, E., McIntosh, M., and Bean, G. (2006) Aflatoxins in ginseng roots. *Food Additives and Contaminants*, 23: 174-180.
145. D'Souza, D.H., Brackett, R.E. (2001) Aflatoxin B1 degradation by *Flavobacterium aurantiacum* in the presence of reducing conditions and seryl and sulfhydryl group inhibitors. *J. Food Prot.* 64, 268-271.
146. Dakovic, A.S., Stojanovic, A.I., Matijasevic, S.D., Rottinghaus, G.E., Sekulic, Z.T., and Stanic, T.T. (2008) Adsorption of T-2 toxin by natural mineral adsorbents. *Hemijaska Industrija*, 62: 59-63.
147. Dashti, B., Al-Hamli, S., Alomirah, H., Al-Zenki, S., Abbas, A.B., and Sawaya, W. (2009) Levels of aflatoxin M1 in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. *Food Control*, 20: 686-690.
148. Dashwood, R., Negishi, T., Hayatsu, H., Breinholt, V., Hendricks, J., and Bailey, G. (1998) Chemopreventive properties of chlorophylls towards aflatoxin B1: a review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout. *Mutat. Res.*, 399: 245–253.
149. Davison, J. (2010) GM plants: Science, politics and EC regulations. *Plant Science*, 178: 94-98.
150. Dawlatana M., Coker R.D., Nagler M.J., Blunden G., (1996) A Normal Phase HPTLC Method for the Quantitative Determination of Ochratoxin A in Rice. *Chromatographia* 42 (1): 25-28
151. De Iongh, H., Beerthuis, R.K., Vles, R.O., Barrett, C.B. and Ord, W.O. (1962) Investigation of the factor in groundnut meal responsible for Turkey “x” disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 65: 548-551.

152. De Magalhaes, J.T., Sodre, G.A., Viscogliosi, H., and Grenier-Loustalot, M.F. (2011) Occurrence of Ochratoxin A in Brazilian cocoa beans. *Food Control*, 22: 744-748.
153. [Dhanasekaran D.](#), [Shanmugapriya S.](#), [Thajuddin N.](#) and [Panneerselvam A.](#) (2011). Aflatoxins and Aflatoxicosis in Human and Animals Chapter: 10/2011; ISBN: 978-953-307-395-8. In book: Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology.
154. Diaz, G.J., Lozano, M.C., and Acuna, A. (2009) Prevalence of *Aspergillus* species on selected Colombian animal feedstuffs and ability of *Aspergillus* section *Flavi* to produce aflatoxins. *World Mycotoxin Journal*, 2: 31-34
155. Dickens, J. and Sepaniak, M., (2000) Modular separation-based fiber-optic sensors for remote α in situ monitoring, *J. Environ. Monit.*, 2: 11–16,.
156. Diekman, M.A. and Green, M.L.C. (1992) Mycotoxins and Reproduction in Domestic Livestock. *J. Anim. Sci*, 70: 1615-1627.
157. Dinkova-Kostova, A.T., Fahey, J.W., Wade, K.L., Jenkins, S.N., Shapiro, T.A., Fuchs, E.J., Kerns, M.L., and Talalay, P. (2007) Induction of the phase 2 response in mouse and human skin by sulforaphane-containing broccoli sprout extracts. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 16: 847–851.
158. Doerr, J.A. (1979): "Mycotoxicosis and avian hematosi." *Diss. Abstr. B Sci. Eng.*, 4127.
159. Doerr, J.A. and Ottinger, M.A. (1980): "Delayed reproductive development resulting from aflatoxicosis in Juvenile Japanese quail." *Poult. Sci.*, 59: 1995-2001.
160. Donmez, N., and Keskin, E. (2008) The Effects of Aflatoxin and Glucomannan on Some Antioxidants and Biochemical Parameters in Rabbits. *Acta Veterinaria-Beograd*, 58.
161. Dorner, J.W. (2004) Biological control of aflatoxin contamination of crops. *J. Toxicol. Toxin Rev.*, 23(2&3):425-450.
162. Dorner, J.W. (2008) Management and prevention of mycotoxins in peanuts. *Food Addit. Contam.*, 25(2):203-208.
163. Dorner, J.W., Cole, R.J., and Wicklow, D.T. (1999) Aflatoxin reduction in corn through field application of competitive fungi, *J. Food Prot.*, 62: 650–656.

164. Dorner, J.W., Cole, R.J., Blankenship, P.D. (1992) Use of a biocompetitive agent to control preharvest aflatoxin in drought stressed peanuts. *J. Food Prot.*, 55(11): 888-892.
165. Dorner, J.W., Cole, R.J., Blankenship, P.D. (1998) Effect of inoculum agents on preharvest aflatoxin contamination of peanuts. *Biol. Control*, 12(3): 171-176.
166. Dorner, J.W., Cole, R.J., Sanders, T.H., and Blankenship, P.D. (1989) Interrelationship of kernel water activity, soil temperature, maturity, and phytoalexin production in preharvest aflatoxin contamination of drought-stressed peanuts, *Mycopathologia*, 105: 117–128.
167. Doster, M.A. and Michailides, T.J. (1994a) *Aspergillus* molds and aflatoxins in pistachio nuts in California, *Phytopathology*, 84: 583–590.
168. Doster, M.A. and Michailides, T.J. (1994b) Development of *Aspergillus* molds in litter from pistachio trees, *Plant Dis*, 78: 393– 397.
169. Doster, M.A. and Michailides, T.J. (1995) The relationship between date of hull splitting and decay of pistachio nuts by *Aspergillus* species, *Plant Dis*, 79: 766–769.
170. Doster, M.A., Michailides, T.J., and Morgan, D.P. (1996) *Aspergillus* species and mycotoxins in figs from California orchards. *Plant Disease*, 80: 484- 489
171. Dowd, P.F. (1998) Involvement of arthropods in the establishment of mycotoxigenic fungi under field conditions, in *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, Sinha, K.K. and Bhatnagar, D., Eds., Marcel Dekker, New York: 307–350.
172. Dowd, P.F. (1998) Involvement of arthropods in the establishment of Mycotoxigenic fungi under field conditions. In: Sinha, K.K., Bhatnagar, D. (Eds.): *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Marcel Dekker, New York: 307-350.
173. Dowd, P.F. (2003) Insect management to facilitate preharvest mycotoxin management, *Journal of Toxicology, Toxin Reviews*, 22(2-3): 327-350.
174. D'Souza, D.H.; Brackett, R.E (1998) The role of trace metal ions in aflatoxin B1 degradation by *Flavobacterium aurantiacum*. *J Food Prot.* 61: 1666-1669.
175. Dvorackova, I., Kusak, V., Vesely, D. and Nesnidal, P. (1977) Aflatoxin and encephalopathy with fatty degeneration of viscera (Reye): *Ann. Nutr. Aliment.*, 31: 977-989.

176. Dvorak, R., Jagos, J., Bouda, J., Piskac, A., Zapletal, O. (1977) Changes in the clinicobiochemical indices in the rumen liquor and urine in cases of experimental aflatoxicosis in dairy cows. *Vet Med (Prague)* 22: 161-169.
177. Eaton, L.D. and Gallhager, E.P. (1994) Mechanism of aflatoxin Carcinogenesis, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 34: 135-72
178. Eddins, A.H. (1930) Corn Diseases in Florida, University of Florida Agricultural Experiment Station, Bulletin 210, Gainesville.
179. Edinboro L.E., Karnes H.T. (2005) Determination of aflatoxin B₁ in sidestream cigarettesmoke by immunoaffinity column extraction coupled with liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* , 1083(1-2), 127-132.
180. EFSA, European Food Safety Authority (2004). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B₁ as undesirable substance in animal feed *The EFSA Journal* (2004) 39: 1-27.
181. EFSA. (2007) European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *EFSA J.* 446: 1-127.
182. Egner, P.A., Wang, J.B., Zhu, Y.R., Zhang, B.C., Wu, Y., Zhang, Q.N., Qian, G.S., Kuang, S.Y., Gange, S.J., Jacobson, L.P., et al. (2001) Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 14601–14606.
183. Ehrlich K.C. and Cotty P.J. (2002) Variability in nitrogen regulation of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains, *Appl Microbiol Biotechnol*, 60: 174–178.
184. Ehrlich K.C., Cary J.W., Montalbano B.G. (1999) Characterization of the promoter for the gene encoding the aflatoxin biosynthetic pathway regulatory protein, AFLR, *Biochim. et Biophys. Acta*, 1444: 412–417.
185. Ehrlich, K.C. and Cotty, P.J. (2004) An isolate *Aspergillus flavus* used to reduce aflatoxin contamination in cottonseed has a defective polyketide synthase gene. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 65(4): 473-478.

186. Ehrlich, K.C., Yu, J., Cotty, P.J. (2005) Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *J. Appl. Microbiol.*, 99(3): 518-527.
187. El Adlouni, C., Tozlovanu, M., Naman, F., Faid, M., and Pfohl-Leszkowicz, A. (2006) Preliminary data on the presence of mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B₁) in black table olives "Greek style" of Moroccan origin. *Mol Nutr Food*.
188. Elias-Orozco, R., Castellanos-Nava, A., Gaytan-Martinez, M., Figueroa-Cardenas, J.D., and Loarca-Pina, G. (2002) Comparison of nixtamalization and extrusion processes for a reduction in aflatoxin content. *Food Additives and Contaminants*, 19: 878-885.
189. Ellis, W.O., Smith, J.P., Simpson, B.K., Oldham, J.H. and Scott, Peter M. (1991) 'Aflatoxins in food: Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30(4): 403-439.
190. El-Nezami, H., Mykkanen, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S., and Ahokas, J. (2000) Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* Strains to Remove Aflatoxin B₁ from the Chicken Duodenum. *Journal of food protection*, Vol. 63, No. 4, pp. 549-552(4).
191. Elzupir, A.O. and Elhussein, A.M. (2010) Determination of aflatoxin M₁ in dairy cattle milk in Khartoum State, Sudan. *Food Control*, 21: 945-946.
192. Elzupir, A.O., Younis, Y.M.H., Fadul, M.H., and Elhussein, A.M. (2009) Determination of Aflatoxins in Animal Feed in Khartoum State, Sudan. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8: 1000-1003.
193. EMAN, (2003). European Mycotoxin Awareness Network co-ordinated by Leatherhead Food Research Association (UK). <http://www.lfra.co.uk/eman/index.htm>
194. Energy, E.C.D.-G.f. (2009) The rapid alert system for food and feed (RASFF) Annual report 2008.
195. EPA (2001) *Bacillus thuringiensis* Plant-Incorporated Protectants, Biopesticide registration action document, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
196. Faberi, A., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R., Laganà, A. (2005) Determination of type B fumonisin mycotoxins in maize and maize-based products by liquid

- chromatography/tandem mass spectrometry using a QqQ(linear ion trap) mass spectrometer. *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 19: 275–282.
197. Fahey, J.W., and Kensler, T.W. (2007) Role of dietary supplements/nutraceuticals in chemoprevention through induction of cytoprotective enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 20: 572–576.
 198. Fahey, J.W., Haristoy, X., Dolan, P.M., Kensler, T.W., Scholtus, I., Stephenson, K.K., Talalay, P., and Lozniewski, A. (2002) Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99: 7610–7615.
 199. Fahey, J.W., Stephenson, K.K., Dinkova-Kostova, A.T., Egner, P.A., Kensler, T.W., and Talalay, P. (2005) Chlorophyll, chlorophyllin and related tetrapyrroles are significant inducers of mammalian phase 2 cytoprotective genes. *Carcinogenesis*, 26: 1247–1255.
 200. Fandohan P, Gnonlonfin B, Hell K, Marasas W.F. and Wingfield M.J. (2005) Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin, West Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 99(2): 173– 183.
 201. FAO (1997) *Worldwide Regulations for Mycotoxins (1995): A Compendium*, Food and Nutrition Paper 64, Food and Agriculture Organization, United Nations, Rome, Italy.
 202. FAO (2005) *A review of cassava in Africa with country case studies on Niger, Ghana, the United Republic of Tanzania, Uganda and Benin. Validation Forum on the Global Cassava Development Strategy*, April 26-28, FAO, Rome, Italy.
 203. FAO, (2004) *Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003 – FAO, Food and Nutrition Paper (FNP) 81*. FAO of the United Nations, Rome.
 204. FAO/WHO (1995). *Application of risk analysis to food standard issues: Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation Food Additives (JECFA)*: WHO, Geneva.
 205. FAO/WHO (2001) *Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food*. FAO Food and Nutrition Paper 74. WHO Food Additives Series 47. Geneva: WHO.

206. FAO/WHO (2002). Global forum of food safety regulators. Proceedings of the Forum; editorial, Marrakech, Morocco, January 2002. FAO/WHO, Rome: 28–30.
207. FAO/WHO (2006) Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Food Safety Risk Analysis. A guide for national food safety authorities. FAO Food and Nutrition Paper 87. Rome: FAO.
208. FDA Food and Drug Administration, USA. (1998) Action levels for added poisonous or deleterious substances in food. Notice Fed. Register 53: 5043–5044.
209. FDA, Food and Drug Administration (1979): "Conference on mycotoxins in animal feeds and grains related to animal health." June, 8, 1979, Rockville, Maryland.
210. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM (2004) GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. (IARC Cancer Base No. 5 Version 2.0), Lyon, IARC.
211. Ferracane, R., Tafuri, A., Logieco, A., Galvano, F., Balzano, D., and Ritieni, A. (2007) Simultaneous determination of aflatoxin B₁ and ochratoxin A and their natural occurrence in Mediterranean virgin olive oil. Food Additives and Contaminants, 24: 173 – 180.
212. Fink-Gremmels, J. (2008) Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. Food Additives and Contaminants, 25: 172-180.
213. Finley, J.W., Robinson, S.F. and Armstrong, D.J. (1992) Food safety Assessment American Chemical Society, Washington, D.C.: 261-275.
214. Fraga, M.E., Curvello, F., Gatti, M.J., Cavaglieri, L.R., et al., (2007) Potential aflatoxin and ochratoxin a production by *Aspergillus* species in poultry feed processing, Vet. Res. Commun., 31: 343–353.
215. Galikeev, K.H.L., Raipov, O.R., Manyasheva, R.A. (1968) Effect of aflatoxin on dynamics of antibody formation. Byul Eksper Bioi Medoc (USSR) 65: 88 (translation).
216. Gams, W., Christensen, M., Onions, A.H., Pitt, J.I. and Samson, R.A. (1985) Infrageneric taxa of *Aspergillus*, in Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics, Samson, R.A. and Pitt, J.I., Eds., Plenum Press, New York: 55–62.
217. Garber, N. and Cotty, P.J. (2006) Timing of Herbicide Applications may Influence Efficacy of Aflatoxin Biocontrol. Beltwide Cotton Conferences, San Antonio, TX, USA p. 11.

218. Garber, R.K. and Cotty, P.J. (1997) Formation of sclerotia and aflatoxins in developing cotton bolls infected by the S strain of *Aspergillus flavus* and potential for biocontrol with an atoxigenic strain, *Phytopathology*, 87: 940–945.
219. Garlich, J.D., Tung, H.T., Hamilton, P.B. (1973) The effects of short term feeding of aflatoxin on egg production and some plasma constituents of the laying hen. *Poult Sci* 52: 2206-2211.
220. Garon D., Richard E., Sage L., Bouchart V., Pottier D., Lebailly P. (2006) Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: Experimental study. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 3479-3484.
221. Geiser, D.M., Dorner, J.W., Horn, B.W. and Taylor, J.W. (2000) The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*, *Fungal Genet. Biol.*, 31(3): 169–179.
222. Geiser, D.M., Pitt, J.I. and Taylor, J.W. (1998) Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(1): 388–393.
223. Georgiadou, M. (2009) A study on the Aflatoxin problem of greek pistachios. Master Thesis, Agricultural University of Athens: 1- 237. (In greek)
224. Ghanem, I., Orfi, M., and Shamma, M. (2008) Effect of Gamma Radiation on the Inactivation of Aflatoxin B1 in Food and Feed Crops. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 787-791.
225. Ghazani, M.H.M., (2009). Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Tabriz (northwest of Iran). *Food and Chemical Toxicology*, 47:1624-1625.
226. Ghiasian, S.A., Shephard, G.S., and Yazdanpanah, H. (2011) Natural Occurrence of Aflatoxins from Maize in Iran. *Mycopathologia*, 1573-0832 (Electronic)0301-486X (Linking).
227. Ghosh, S.K., Desai, M.R., Pandya, G.L. and Venkaiah, K. (1997) Airborne aflatoxin in the grain processing industries in India. *Am. ind. Hyg. Assoc. J.*, 58: 583–586.
228. Gimeno A. (2004) Aflatoxina M1 no leite. Riscos para a saúde pública, prevenção e controlo. *Alimentação Animal [Revista de la Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais (IACA)]*, 49: 32-44.
229. Giray, B., Girgin, G., Engin, A. B., Aydin, S., and Sahin, G. (2007) Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. *Food Control*, 18: 23-29.

230. Gökmen, V., Acar, J. (1999) Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 847, 69–74.
231. Goldblatt, L.A. (cd) (1969) *Aflatoxin Scientific Background Control and Implications*. Academic Press, New York.
232. Gomez, D., Garcia, I., Scazzocchio, C. and Cubero, B. (2003) Multiple GATA sites: Protein binding and physiological relevance for the regulation of the proline transporter gene of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 50: 277–289.
233. Gong YY, Cardwell K, Hounsa A, Egal S, Turner PC, Hall AJ, Wild, CP. (2002) Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Benin and Togo: cross sectional study. *BMJ* 325(7354): 20-21.
234. González-Peñas, E., Leache, C., López de Cerain, A., Lizarraga, E. (2006) Comparison between capillary electrophoresis and HPLC-FL for ochratoxin A quantification in wine. *Food Chem.*, 97: 349–354.
235. Goryacheva, I.Y., De Saeger, S., Eremin, S.A., Van Peteghem, C., (2007) Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: Evolution from single to multiple analyte screening: A review, *Food Addit. Contam.*, 24: 1169 –1183.
236. Goto, T., Wicklow, D.T. and Ito, Y. (1996) Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamaris* strain, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4036–4038.
237. Gowda, N.K.S., and Ledoux, D.R. (2008) Use of antioxidants in amelioration of mycotoxin toxicity: A review. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 8: 1-11.
238. Greene-McDowelle, D.M., Ingber, B., Wright, M.S., Zeringue, H.J. Jr., Bhatnagar, D., Cleveland, TE. (1999) Effect of selected cotton leaf-life volatiles on growth, development and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*, *Toxicon*, 37: 883–893.
239. Griffin, G.J. (1972) Conidial germination and population of *Aspergillus flavus* in the geocarposphere of peanut, *Phytopathology*, 62: 1387–1391.
240. Griffin, G.J. and Garren, K.H. (1974a) Colonization of aerial peanut pegs by *Aspergillus flavus* and *A. niger*-group fungi under field conditions, *Phytopathology*, 66: 1161–1162.
241. Griffin, G.J. and Garren, K.H. (1974b) Population levels of *Aspergillus flavus* and the *A. niger* group in Virginia peanut field soils, *Phytopathology*, 64: 322–325.

242. Groopman J.D., Donahue P.R., Zhu J.Q., Chen J.S. and Wogan G.N. (1985) Aflatoxin metabolism in humans: detection of metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity chromatography. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 82, 6492-6496.
243. Groopman, J.D., Johnson, D., Kensler, T.W. (2005) Aflatoxin and hepatitis B virus biomarkers: a paradigm for complex environmental exposures and cancer risk. *Cancer Biomark* 1(1): 5-14.
244. Groopman, J.D., Kensler, T.W. and Wild C.P.. (2008) Protective Interventions to Prevent Aflatoxin-Induced Carcinogenesis in Developing Countries. *Annual Review of Public Health*, 29(1): 187-203.
245. Groopman, J.D., Kensler, T.W., Wild, C.P. (2008) Protective interventions to prevent aflatoxin-induced carcinogenesis in developing countries. *Annu Rev Public Health* 29: 187-203.
246. Guo, B.Z., Russin, J.S., Brown, R.L., Cleveland, T.E., and Widstrom, N.W. (1996) Resistance to aflatoxin contamination in corn as influenced by relative humidity and kernel germination, *J. Food. Prot.*, 59: 276–281.
247. Guo, B.Z., Sobolev, V., Holbrook, C.C., Lynch, R.E. (2003) Impact of phytoalexins and lesser cornstalk borer damage on resistance to aflatoxin contamination. *Phytopathology*, 93: S31.
248. Gupta, A. and Gopal, M. (2002) Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* isolates pathogenic to coconut insect pests, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 18(4): 325–331.
249. Gurbay, A., Aydin, S., Girgin, G., Engin, A. B., Sahin, G., (2006) Assessment of aflatoxin M1 levels in milk in Ankara, Turkey, *Food Control*, 17: 1–4.
250. Guthrie LD (1979) Effects of aflatoxin in com on production and reproduction in dairy cattle. *J Dairy Sci* 62: 134.
251. Hadavi, E. (2005) Several physical properties of aflatoxin-contaminated pistachio nuts: Application of BGY fluorescence for separation of aflatoxin-contaminated nuts. *Food Additives and Contaminants*, 22: 1144–1153.
252. Halasz, A., Lasztity, R., Abonyi, T., and Bata, A. (2009) Decontamination of Mycotoxin-Containing Food and Feed by Biodegradation. *Food Reviews International*, 25: 284-298.
253. Hall, A.J. and Wild, C.P. (1994) Epidemiology of aflatoxin-related disease, in Eaton, D.L. and Groopman, J.D., Eds., *The Toxicology of Aflatoxins: Human*

- Health, Veterinary, and Agricultural Significance, Academic Press, San Diego, California: 233-258.
254. Halver, J.E. (1969) Aflatoxins and trout hepatoma. In: Goldblatt LA (ed) Aflatoxin. Academic Press, New York, pp 265-306.
 255. Hameed, H.G., (1993). Extrusion and chemical treatments for destruction of aflatoxin in naturally contaminated corn. PhD thesis, University of Arizona.
 256. Hamilton, P.B. (1971) A natural and extremely severe occurrence of aflatoxicosis in laying hens. *Poult Sci* 50: 1880-1882.
 257. Hamilton, P.B. and Garlich, J.D. (1972): "Failure of vitamin supplementation to alter the fatty liver syndrome by aflatoxin." *Poult. Sci.*, 51: 688.
 258. Hamilton, P.B., Garlich, J.D. (1971) Aflatoxin as a possible cause of fatty liver syndrome in laying hens. *Poult Sci* 50: 800-804.
 259. Hao Y.Y., Brackett R.E. (1988) Removal of aflatoxin B1 from peanut milk inoculated with *Flavobacterium aurantiacum*. *J Food Sci.* 53: 1384-1386.
 260. Hartley, R.D.; Nesbitt, B.F. and O'Kelly, J. (1963) Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, 198: 1056-1058.
 261. Hawkins L.K., Windham G.L., Williams W.P. (2005). Effect of different post-harvest drying temperatures on *Aspergillus flavus* survival and aflatoxin content in five maize hybrids. *J Food Prot.* 68: 1521–1524.
 262. Hayashi, Y., Yoshizawa, T. (2005) Analysis of cyclopiazonic acid in corn and rice by a newly developed method. *Food Chem.* 93: 215–221.
 263. Helferich W.G., Baldwin R.L. and Hsieh D.P.H.. (1986) [14 C]-Aflatoxin B1 Metabolism in Lactating Goats and Rats. *Journal of Animal Science*, 62: 697-705.
 264. Hendrickse, R.G. (1991) Kwashiorkor: The Hypothesis That Incriminates Aflatoxins. *Pediatrics* 1991, 88: 376.
 265. Hendrickse, R.G., Coulter, J.B.S., Lamplugh, S.M., MacFarlane, S.B.J., Williams, T.E., Omer, M.I.A. and Suliman, G.I. (1982) Aflatoxins and Kwashiorkor: a study in Sudanese children. *Br. Med. J.*, 285: 843-846.
 266. Henry, S.H., Bosch, R.X., Troxell, R.C., and Bolger, P.M. (1999) Public health: reducing liver cancer — global control of aflatoxin, *Science*, 286: 2453–2454.
 267. Hernández Hierro, J.M., Garcia-Villanova, R.J., Rodríguez Torrero, P., (2008) Toruño Fonseca, I.M. Aflatoxins and ochratoxin a in red paprika for retail sale in Spain: Occurrence and evaluation of a simultaneous analytical method. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 751–756.

268. Herzallah, S.M. (2009) Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry*, 114(3): 1141-1146.
269. Hicks, J.K., Yu, J.H., Keller, N.P. and Adams, T.H. (1997) *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FADA G protein-dependent signaling pathway. *EMBO J*, 16: 4916–4923.
270. Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T., Sakai, S., and Kurata, H. (1978) Fungal Contamination and Mycotoxin Detection of Powdered Herbal Drugs. *Applied and Environmental Microbiology*, 36: 252-256.
271. Holbrook, C.C., Kvien, C.K., Ruckers, K.S., Wilson, D.M., and Hook, J.E. (2000) Preharvest aflatoxin contamination in drought tolerant and intolerant peanut genotypes, *Peanut Sci.*, 27: 45–48.
272. Holbrook, C.C., Matheron, M.E., Wilson, D.M., Anderson, W.F., Will, M.E., and Norden, A.J. (1994) Development of a large-scale field system for screening peanut for resistance to preharvest aflatoxin contamination, *Peanut Sci.*, 21, 20–22.
273. Horn, B.W. and Dorner, J.W. (1998) Soil populations of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect through peanut-growing regions of the United States, *Mycologia*, 90(5): 767–776.
274. Horn, B.W. and Dorner, J.W. (1999) Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1444–1449.
275. Horn, B.W., Dorner, J.W., Greene, R.L., Blankenship, P.D., and Cole, R.J. (1994) Effect of *Aspergillus parasiticus* soil inoculum on invasion of peanut seeds, *Mycopathologia*, 125: 179–191.
276. Horn, B.W., Greene, R.L., and Dorner, J.W. (1995) Effect of corn and peanut cultivation on soil populations of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in southwestern Georgia, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2472–2475.
277. Horn, B.W., Greene, R.L., Sobolev, V.S., Dorner, J.W., Powell, J.H. and Layton, R.C. (1996) Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii*, *Mycologia*, 88(4): 574–587.

278. Horn, C.W. Boleman, L.L., Coffman, C.G., Deton, J.H., and Lawhorn, D.B. (1989) Mycotoxins in feed and food producing crops college state Texas. *Texas Vet. Med. Diagnostic*, The National Dairy Database (1992)
279. Hoseyni MS. (1992) Risk assessment for aflatoxin: III. Modeling the relative risk of hepatocellular carcinoma. *Risk Anal.* 12: 123-126.
280. Howarth, B.Jr. and Wyatt, R.D. (1976): "Effect of dietary aflatoxin on fertility, hatchability and progeny performance of broiler breeder hens" *Appl. Environ. Microbiol.*, 31: 680-684.
281. Huff, W.E., Wyatt, R.D. and Hamilton, P.B. (1975): "Effects of dietary aflatoxin on certain egg yolk parameters." *Poult. Sci.*, 54: 2014-2018.
282. Hurburgh, C.R. (1991) Aflatoxin in midwestern corn, in *Aflatoxin in Corn: New Perspectives*, Iowa State University Research Bulletin No. 599: 343-357, Iowa State University, Ames.
283. Hussain, I., Anwar, J., (2008) A study on contamination of aflatoxin M1 in raw milk in the Punjab province of Pakistan, *Food Control*, 19: 393–395.
284. Hussein, H.S. and J.M. Brasel (2001). Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167: 101-134.
285. Hwang, J.-H., and Lee, K.-G. (2006) Reduction of aflatoxin B1 contamination in wheat by various cooking treatments. *Food Chemistry*, 98: 71-75.
286. IARC (1993): Some naturally occurring substances : Food items and constituents. IARC monographs on Evaluation of carcinogenic risk to humans No. 56.
287. IARC (2002) "Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene: Aflatoxins", Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, IARC Press, 82: 171-274.
288. IARC, (2002). Monograph on the Carcinogenic Risks to Humans .IARC MONOGRAPHS VOLUME 82. Aflatoxins.: 171-300.
289. IARC. (2002). Some Traditional Herbal Medicines, some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. Summary of Data Reported and Evaluation. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 82, p. 590. IARC (International Agency for Research on Cancer), WHO (World Health Organization), Lyon, France.
290. Idris, Y.M.A., Mariod, A.A., Elnour, I.A., and Mohamed, A.A. (2010) Determination of aflatoxin levels in Sudanese edible oils. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 2539-2541.

291. Ismail, N., Leong, Y.H., Latif, A.A., and Ahmad, R. (2010) Aflatoxin occurrence in nuts and commercial nutty products in Malaysia. *Food Control*, 21: 334-338.
292. Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D.T. and Goto, T. (2001) *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*, *Mycol. Res.*, 105: 233–239.
293. Jaime-Garcia, R. and Cotty, P.J. (2003) Aflatoxin contamination in commercial cottonseed in South Texas. *Phytopathology*, 93: 1190–1200.
294. Jaime-Garcia, R. and Cotty, P.J. (2006a) Spatial distribution of *Aspergillus flavus* and its toxigenic strains on commercial cottonseed from South Texas and its relationship to aflatoxin contamination. *Plant Pathology*, 55: 358–366.
295. Jaime-Garcia, R. and Cotty, P.J. (2006b) Spatial relationships of soil texture and crop rotation to *Aspergillus flavus* community structure in South Texas. *Phytopathology*, 96: 599–607.
296. Jalili, M., Jinap, S., and Noranizan, A. (2010) Effect of gamma radiation on reduction of mycotoxins in black pepper. *Food Control*, 21: 1388-1393.
297. Jayashree, T. and Subramanyam, C. (2000) Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*, *Free Radic. Biol. Med.*, 29: 981-985.
298. Ji, C., Zhao, L.H., Guan, S., Gao, X., Ma, Q.G., Lei, Y.P., and Bai, X.M. (2011) Preparation, purification and characteristics of an aflatoxin degradation enzyme from *Myxococcus fulvus* ANSM068. *Journal of Applied Microbiology*, 110: 147-155.
299. Johnson, S.J. and Smith, J.W. (1981) Ecology of *Elasmopalpus lignosellus* parasite complex on peanuts in Texas, *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 74: 467–471.
300. Jones, R.K. and Duncan, H.E. (1981) Effect of nitrogen fertilizer, planting date, and harvest date on aflatoxin production in corn inoculated with *Aspergillus flavus*, *Plant Dis.*, 65: 741–744.
301. Jones, R.K., Duncan, H.E. and Hamilton, P.B. (1981) Planting date, harvest date, and irrigation effects on infection and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in field corn, *Phytopathology*, 71: 810.
302. Jones, R.K., Duncan, H.E., Payne, G.A. and Leonard, K.J. (1980) Factors influencing infection by *Aspergillus flavus* in silk-inoculated corn, *Plant Dis.*, 64: 859.

303. Jornet, D., Busto, O., Guasch, J. (2000) Solid-phase extraction applied to the determination of ochratoxin A in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 882: 29–35.
304. Jubert, C., Mata, J. E., Bench, G., Dashwood, R., Pereira, C., Tracewell, W., Turteltaub, K.W., Williams, D., and Bailey, G. (2009) Effects of chlorophyll and chlorophyllin on low-dose aflatoxin B1 pharmacokinetics in human volunteers. *Cancer Prev. Res.*, 2: 1015–1022.
305. Kabak, B, Dobson, A.D.W., Var, I. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 46: 593–619.
306. Kale, S.P., Cary, J.W., Baker, C., Walker, D., Bhatnagar, D. and Bennett, J.W. (2003) Genetic analysis of morphological variants of *Aspergillus parasiticus* deficient in secondary metabolite production. *Mycol Res*, 107(7): 831–840.
307. Kana, J.R., Tegua, A., Mungfu, B.M., and Tchoumboue, J. (2011) Growth performance and carcass characteristics of broiler chickens fed diets supplemented with graded levels of charcoal from maize cob or seed of *Canarium schweinfurthii* Engl. *Tropical Animal Health and Production*, 43: 51-56.
308. Kankaapaa P., Tuomola E., El Nezami H. S., Ahokas J. T., and Salminen S. J. (2000) Binding of aflatoxin B1 alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a caco- 2 model. *J. Food Prot.* 63: 412-414.
309. Karunaratne A. Wezenberg E., and Bullerman L. B. (1990) Inhibition of mold growth and aflatoxin production by *Lactobacillus* sp. *J. Food Prot.* 53: 230-234.
310. Katerere, D.R., Thembo, K.M., Vismer, H.F., Nyazema, N.Z., and Gelderblom, W.C.A. (2010) Antifungal activity of four weedy plant extracts against selected mycotoxigenic fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 109: 1479- 1486.
311. Katherine, M., Fernando, A., Jia, S.W., and Andrea, M.A. (1997) AFB1 induced DNA adduct formation and p53 mutation in CYP450 expressing human liver cell lines. *Carcinogenesis*. Vol. 18 no. 7 pp. 1291 - 1297.
312. Kato, N., Brooks, W. and Calvo, A.M. (2003) The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by veA, a gene required for sexual development. *Eukaryotic Cell*, 2: 1178–1186.
313. Keller, K.M., Keller, L.A.M., de Oliveira, A.A., Almeida, T.X., Garcia, R.D., and Rosa, C.A.D. (2008) Mycotoxicological Evaluation of Feedstuffs Intended for

- Dairy Goats in Teresopolis, Rj, Brazil. *Revista Brasileira De Medicina Veterinaria*, 30: 91-96.
314. Kensler, T.W., Chen, J.G., Egner, P.A., Fahey, J.W., Jacobson, L.P., Stephenson, K.K., Ye, L.X., Coady, J., Wang, J.B., Wu, Y., et al. (2005) Effects of glucosinolate-rich broccoli sprouts on urinary levels of aflatoxin- DNA adducts and phenanthrene tetraols in a randomized clinical trial in He Zuo Township, Qidong, People's Republic of china. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14: 2605–2613.
 315. Kensler, T.W., Groopman, J.D., Sutter, T.R., Curphey, T.J., and Roebuck, B.D. (1999) Development of cancer chemopreventive agents: oltipraz as a paradigm. *Chem. Res. Toxicol.* 12: 113–126.
 316. Kensler, T.W., He, X., Otieno, M., Egner, P.A., Jacobson, L.P., Chen, B., Wang, J.S., Zhu, Y.R., Zhang, B.C., Wang, J.B., Wu, Y., et al. (1998) Oltipraz chemoprevention trial in Qidong, People's Republic of China: modulation of serum aflatoxin albumin adduct biomarkers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7: 127–134.
 317. Kensler, T.W., Roebuck, B.D., Wogan, G.N., and Groopman, J.D. (2011) Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicological Sciences*, 120 Suppl 1: S28-48,1096-0929 (Electronic)1096-0929 (Linking)
 318. Kensler, T.W., Wakabayashi, N., and Biswal, S. (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47: 89–116.
 319. [Khlanguiset, P.](#), [Shephard, G.S.](#), [Wu, F.](#), (2011) Aflatoxins and growth impairment: a review. [Crit Rev Toxicol](#). 2011 Oct, 41(9): 740-55. Epub 2011 Jun 28.
 320. Klich, M.A. (2002) Identification of Common Aspergillus Species, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 116.
 321. Klich, M.A. and Chmielewski, M.A. (1985) Nectaries as entry sites for Aspergillus flavus in developing cotton bolls, *Appl Environ Microbiol*, 50: 602–604.
 322. Klich, M.A. and Pitt, J.I. (1988) Differentiation of Aspergillus flavus from A. parasiticus and other closely related species. *Trans. Br. Mycol. Soc*, 91: 99-108.

323. Klich, M.A., Thomas, S.H. and Mellon, J.E. (1984) Field studies on the mode of entry of *Aspergillus flavus* into cotton seeds, *Mycopathologia*, 76: 665–669.
324. Klich, M.A., Tiffany, L.H. and Knaphus, G. (1992) Ecology of the aspergilli of soils and litter, in *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*, Bennett, J.W. and Klich, M.A., Eds., Butterworth-Heinemann, Boston, MA: 329–353.
325. Köller, G., Wichmann, G., Rolle-Kampczyk, U., Popp, P., Herbarth, O. (2006) Comparison of ELISA and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection in the analysis of Ochratoxin A in low volumes of human blood serum. *J. Chromatogr. B*, 840: 94–98.
326. Kolosova, A.Y., Shim, W.-B., Yang, Z.-Y., Eremin, S.A., Chung, D.-H., (2006) Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B1, Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples, *Anal. Bioanal. Chem.*, 384: 286–294.
327. Kos, G., Lohninger, H., Krska, R. (2002) Fourier transform mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FT-IR/ATR) as a tool for the detection of *Fusarium* fungi on maize. *Vibr. Spectrosc.*, 29: 115–119.
328. Kourousekos G., Theodosiadou E., Belibasaki S., Deligiannis K., Koukoulas T., Zoulfos K., Lymberopoulos A.G., (2012). Effects of aflatoxin B1 administration on Greek indigenous goats' milk *International Dairy Journal*, 24(2): 123–129.
329. Kourousekos, G.D. and Lymberopoulos A.G. (2007) Occurrence of aflatoxins in milk and their effects on reproduction *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 58(4): 306-312.
330. Kralj Cigić, I., Strlič, M., Schreiber, A., Kocjančič, M., Pihlar, B. (2006) Ochratoxin A in wine: Its determination and photostability. *Anal. Lett.*, 39: 1475–1488.
331. Kratzer, F.H., Bandy, D., Wiley, M., Booth, A.N. (1968) Aflatoxin effects in poultry. *Proc Soc Exp Bioi Med* 131: 1281-1284.
332. Krishnamachari, K.A.V.R., Bhat, R.V., Nagarajan, V. and Tilak T.B.G. (1975a) Investigations into an outbreak of hepatitis in parts of Western India. *Ind. J. Med. Res.* 63: 1036-1048.
333. Krishnamachari, K.A.V.R., Bhat, R.V., Nagarajan, V., Tilac, T.B.G. (1975b) Hepatitis due to aflatoxicosis. *Lancet* 1:1061-1063.
334. Krska, R., Welzig, E., Boudra, H. (2007) Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Animal Feed Sci. Technol.*, 137: 241–264.

335. Kuiper-Goodman, T., (1991) Risk assessment to humans of mycotoxins in animal-derived food products. *Vet. Hum. Toxicol.* 33: 325–333.
336. Kuiper-Goodman, T., (2004) Risk assessment and risk management of mycotoxins in food. In: Mogan, N., Olsen, M. (Eds.), *Mycotoxins in Food, Detection and Control*. CRC Press, New York; Wood head Publishing Limited, Cambridge, England: 3–31.
337. Kumar, V., Basu, M.S., and Rajendran, T.P. (2008) Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection*, 27: 891-905.
338. Kumari, N., Kumar, P., Mitra, D., Prasad, B., Tiwary, B.N., and Varshney, L. (2009) Effects of Ionizing Radiation on Microbial Decontamination, Phenolic Contents, and Antioxidant Properties of Triphala. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*, 74: M109-M113.
339. Kussak, A., Andersson, B. and Andersson, K. (1995) Determination of aflatoxins in airborne dust from feed factories by automated immunoaffinity column clean up and liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 708: 55–60.
340. Lafontaine, M., Delsaut, P., Morelle, Y. and Taiclet, A. (1994) [Aflatoxins: Sampling and analysis in animal feed production plant.] *Cahiers Notes documentaires*, 156: 297–305.
341. Laganà, A., Curini, R., D'Ascenzo, G., De Leva, I., Faberi, A., Pastorini, E. (2003) Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the identification and determination of trichothecenes in maize. *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 17: 1037–1043.
342. Langseth, W., Rundberget, T. (1998) Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *J. Chromatogr. A*, 815: 103–121.
343. Lee, L.S., Lee, Jr., L.V., and Russell, T.E. (1986) Aflatoxin in Arizona cottonseed: field inoculation of bolls by *Aspergillus flavus* spores in wind-driven soil, *J. AOCS*, 63: 530–532.
344. Leger St., R.J., Screen, S.E. and Shams-Pirzadeh, B. (2000) Lack of host specialization in *Aspergillus flavus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(1): 320–324.
345. Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Lubber, G., Kieszak, S., Nyamongo, J., Backer, L., Dahiye, A., Misore, A., DeCock, K., Rubin, C. (2005) Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of

- acute aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. *Environmental Health Perspectives*, 113: 1762–1767.
346. Liao, B.-C., Jong, T.-T., Lee, M.-R., Chang, C.-M.J., (2007) Super-critical fluid extraction and quantification of aflatoxins in *Zizyphi Fructus* by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun.Mass Spectrom.*, 21: 667–673.
 347. Liggett, A.D.; Colvin, B.M.; Beaver, R.W. and Wilson, D.M. (1986): "Canine aflatoxicosis: A continuing problem" *Vet. Hum. Toxicol.*, 28: 428-430.
 348. Lillehoj E.B., Logoida A.B., and Maisch W.F. (1979) The fate of aflatoxin in naturally contaminated corn during the ethanol fermentation. *Can. J. Microbiol.* 25: 911-914.
 349. Lillehoj, E.B. (1983) Effect of environmental and cultural factors on aflatoxin contamination of developing corn kernels, in *Aflatoxin and Aspergillus flavus in Corn*, Diener, U.L., Asquith, R.L., and Dickens, J.W., Eds., Southern Coop Series Bull. No. 279, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn AL: 27–34.
 350. Lillehoj, E.B., Kwolek, W.F., Shannon, G.M., Shotwell, O.L. and Hesseltine, C.W. (1975) Aflatoxin occurrence in 1973 corn at harvest, I. A limited survey in the southeastern U.S., *Cereal Chemistry*, 51: 603–611.
 351. Lillehoj, E.B., Kwolek, W.F., Shannon, G.M., Shotwell, O.L. and Hesseltine, C.W. (1975) Aflatoxin occurrence in 1973 corn at harvest, I. A limited survey in the southeastern U.S., *Cereal Chemistry*, 51: 603-611.
 352. Lillehoj, E.B., Kwolek, W.F., Zuber, M.S., Calvert, O.H., Horner, E.S., Widstrom, N.W., Guthrie, W.D., Scott, G.E., Thompson, D.L., Findley, W.R., and Bockholt, A.J. (1978) Aflatoxin contamination of field corn: evaluation of regional test plots for early detection, *Cereal Chem.*, 55: 1007–1013.
 353. Lillehoj, E.B., McMillian, W.W., Guthrie, W.D., and Barry, D. (1980) Aflatoxin-producing fungi in preharvest corn: inoculum source in insects and soils, *J. Environ. Qual.*, 9: 691–694.
 354. Lin, L., Zhang, J., Wang, P., Wang, Y., Chen, J. (1998) Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *J. Chromatogr. A*, 815: 3–20.
 355. Lin, Y.L., Wang, T.H., Lee, M.H., and Su, N.W. (2008) Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77: 965-973.

356. Line J. E. and Brackett R. E. (1995) Factors affecting aflatoxin B1 removal by *Flavobacterium aurantiacum*. *Journal of Food Protection* 58: 91-94.
357. Line J. E., Brackett R. E. and Wilkinson R.E. (1994) Evidence for degradation of aflatoxin B1 by *Flavobacterium aurantiacum*. *J Food Prot* 57: 788-791.
358. Ling, K., Wang, J.J., Wu, R., Tung, T.G., Lin, S.S. and Lin, T.M. (1967) Intoxication possibly caused by aflatoxin B1 in the moldy rice in Shuang-Chih township. *J. Formosan Med. Assoc*, 66: 729.
359. Liu, Y. and Wu, F. (2010) Global Burden of Aflatoxin-Induced Hepatocellular Carcinoma: A Risk Assessment. *Environ Health Perspect* 118: 818-824.
360. Llorens, A., Mateo, R., Mateo, J.J., Jiménez, M. (2002) Comparison of extraction and clean-up procedures for analysis of zearalenone in corn, rice and wheat grains by high-performance liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. *Food Addit. Contam.*, 19: 272–281.
361. Lopes, P.R.S., Pouey, J.L.O.F., Enke, D.B.S., Mallmann, C.A., Kich, H.A., and Soquetta, M.B. (2009) Use of adsorbent in diets containing aflatoxin for silver catfish fingerlings. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science*, 38: 589-595.
362. López C.E., Ramos L.L., Ramadan S.S. and Bulacio L.C.. (2003) Presence of aflatoxins M1 in milk for human consumption in Argentina. *Food Control*, 14: 31–34.
363. Luo, H., Tang, L., Tang, M., Billam, M., Huang, T., Yu, J., Wei, Z., Liang, Y., Wang, K., Zhang, Z.Q., et al. (2006) Phase IIa chemoprevention trial of green tea polyphenols in high-risk individuals of liver cancer: modulation of urinary excretion of green tea polyphenols and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Carcinogenesis* 27: 262–268.
364. Lussenhop, J. and Wicklow, D.T. (1990) Nitidulid beetles (Nitidulidae: Coleoptera) as vectors of *Aspergillus flavus* in pre-harvest maize, *Trans. Mycol. Soc. Jpn.*, 31: 63–74.
365. Lynch, R.E. and Wilson, D.M. (1991) Enhanced infection of peanut, *Arachis hypogaea* L., seeds with *Aspergillus flavus* group due to external scarification of peanut pods by lesser cornstalk borer, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller): *Peanut Sci*, 18: 110– 116.
366. Lynch, R.E., Wightman, J.A., and Ranga Rao, G.V. (1997) Insects and arthropods, in *Compendium of Peanut Diseases*, 2nd ed., Kokalis-Burelle, N.,

- Porter, D.M., Rodríguez-Kábana, R., Smith, D.H., and Subrahmanyam, P., Eds., APS Press, St. Paul, MN: 65–69.
367. Macdonald, S., and Castle, L. (1996) A UK retail survey of aflatoxins in herbs and spices and their fate during cooking. *Food Additives and Contaminants*, 13: 121-128.
 368. Magan, N. and Aldred, D. (2007) Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *Int J Food Microbiol.* 119: 131–139.
 369. Magan, N., Olsen, M. (2004) *Mycotoxins in Food - Detection and Control*. In. Cambridge Woodhead Publishing 978-1-85573-733-4.
 370. Magan, N. and Olsen, M. (2004) *Mycotoxins in Food - Detection and Control*. In. Cambridge Woodhead Publishing 978-1-85573-733-4
 371. Maggon, K.K., Gupta, S.K. and Venkitasubramanian, T.A. (1977) Biosynthesis of aflatoxins, *Bact Rev*, 41: 822–855.
 372. Magnoli, A.P., Tallone, L., Rosa, C.A.R., Dalcero, A.M., Chiacchiera, S.M., and Torres Sanchez, R.M. (2008). Commercial bentonites as detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin. *Appl. Clay Sci.* 40: 63-71.
 373. Mahoney, N. and Molyneux, R.J. (2004) Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*): *J Agric Food Chem*, 52(7): 1882- 1889.
 374. Manafi, M., Umakantha, B., Swamy, H.D.N., and Mohan, K. (2009) Evaluation of high-grade sodium bentonite on performance and immune status of broilers, fed ochratoxin and aflatoxin. *World Mycotoxin Journal*, 2: 435-440
 375. Maragos, C.M. (1997) Detection of the mycotoxin fumonisin B1 by a combination of immunofluorescence and capillary electrophoresis, *Food Agric. Immunol.*, 9: 147–157.
 376. Maragos, C.M., Appell, M., Lippolis, V., Visconti, A., Catucci, L., Pascale, M. (2008) Use of cyclodextrins as modifiers of fluorescence in the detection of mycotoxins. *Food Addit. Contam.*, 25: 164–171.
 377. Maragou, N.C., Rosenberg, E., Thomaidis, N.S., Koupparis, M.A. (2008) Direct determination of the estrogenic compounds 8-prenylnaringenin, zearalenone, alpha- and beta-zearalenol in beer by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1202: 47–57.

378. Markov, K., Frece, J., Cvek, D., Lovric, N., and Delas, F. (2010) Aflatoxin M-1 in raw milk and binding of aflatoxin by lactic acid bacteria. *Mljekarstvo*, 60: 244-251.
379. Marsi, M.S.; Booth, A.N.; and Hsieh, D.P.H. (1974) Comparative metabolic conversation of aflatoxin B1 in aflatoxin M1 and Q1. *Life Science*(15: 203-209.
380. Martyniuk, S. and Wagner, G.H. (1978) Quantitative and qualitative examination of soil microflora associated with different management systems, *Soil Sci.*, 125: 343–350.
381. Masoero F., Gallo A., Moschini M., Piva G. and Díaz D. (2007) Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal*, 1: 1344–1350.
382. Masoud, W. and Kaltoft, C.H. (2006) The effects of yeasts involved in the fermentation of coffea arabica in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 106(2): 229-234.
383. Masri MS, Garcia VC, Page JR (1969) The aflatoxin MI content of milk from cows fed known amounts of aflatoxin. *Vet Rec* 84: 146-147.
384. Maxwell S. M., Apeangyei F., de Vries H. R., Mwamut D. D., and Hendrickse R. G. (1998). Aflatoxins in breast milk, neonatal coral blood and sera of pregnant women. *J Toxicol Toxin Rev* 8(1-2): 19-29.
385. Mayer, S., Engelhart, S., Kolk, A., and Blome, H. (2008) The significance of mycotoxins in the framework of assessing workplace related risks. *Mycotoxin Research*, 24(3): 151-164.
386. Mazzette A., Decandia M., Acciaro M., Fenu, Francesconi A.D. and Battacone A.H.. (2009) Excretion of Aflatoxin M1 in milk of goats fed diet contaminated by Aflatoxin B1, *Italian Journal of Animal Science*, 8(2): 631-633.
387. McAlpin, C.E., Wicklow, D.T. and Horn, B.W. (2002) DNA fingerprinting analysis of vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus* from a peanut field in Georgia, *Plant Dis.*, 86(3): 254–258.
388. McAlpin, C.E., Wicklow, D.T., and Platis, C.E. (1998) Genotypic diversity of *Aspergillus parasiticus* in an Illinois corn field, *Plant Dis.*, 82: 1132–1136.
389. McGee, D.C., Olanya, O.M. and Hoyos, G.M. (1996) Populations of *Aspergillus flavus* in the Iowa cornfield ecosystems in years not favorable for aflatoxin contamination of corn grain, *Plant Dis*, 80: 742–746.

390. McMillian, W.W., Widstrom, N.W., and Wilson, D.M. (1985b) Insect damage and aflatoxin contamination in preharvest corn: influence of genotype and ear wetting, *J. Entomol. Sci.*, 20: 66–68.
391. McMillian, W.W., Wilson, D.M., and Widstrom, N.W. (1985a) Aflatoxin contamination of preharvest corn in Georgia: a six-year study of insect damage and visible *Aspergillus flavus*, *J. Environ. Qual.*, 14: 200–202.
392. Medina M.B. and Schwartz D.P. (1992) [Thin-layer chromatographic detection of zeranol and estradiol in fortified plasma and tissue extracts with Fast Corinth V](#)
393. Méndez-Albores A. and Moreno-Martínez E. (2009) Las Micotoxinas: Contaminantes naturales de los alimentos”. *Revista Ciencia*, julio-septiembre 2009: 1-7.
394. Mendez-Albores, A., Arambula-Villa, G., Loarca-Pina, M.G., Castano-Tostado, E., and Moreno-Martinez, E. (2005) Safety and efficacy evaluation of aqueous citric acid to degrade B-aflatoxins in maize. *Food Chem Toxicol*, 43: 233-238.
395. Mendez-Albores, A., Del Rio-Garcia, J.C., and Moreno-Martinez, E. (2007) Decontamination of aflatoxin duckling feed with aqueous citric acid treatment. *Animal Feed Science and Technology*, 135: 249-262.
396. Mendez-Albores, A., Veles-Medina, J., Urbina-Alvarez, E., Martinez-Bustos, F., and Moreno- Martinez, E. (2009) Effect of citric acid on aflatoxin degradation and on functional and textural properties of extruded sorghum. *Animal Feed Science and Technology*, 150: 316-329.
397. Mertens DR (1979) Biological effects of mycotoxins upon rumen function and lactating dairy cows. In: *Proceedings of Symposium on Interaction of Mycotoxins in Animal Production*, Michigan State Univ, Lansing, July 13, 1978. *Nat! Acad Sci*, Washington, DC, pp 118-136.
398. Meyers, D.M., Obrian, G., Du, W.L., Bhatnagar, D. and Payne, G.A. (1998) Characterization of aflJ, a gene required for conversion of pathway intermediate to aflatoxin. *Appl Environ Microbiol*, 64: 3713–3717.
399. Miller, O.M., Crowell, W.A., Stuart, B.P. (1982) Acute aflatoxicosis in swine: Clinical pathology, histopathology, and electron microscopy. *Am J Vet Res* 43:273-277.
400. Miller, O.M., Stuart, B.P., Crowell, W.A. (1981) Experimental aflatoxicosis in swine. Morphological and clinical pathological results. *Can J Corp Med* 45:343-351.

401. Mixon A.G. (1981) Reducing aflatoxin contamination in peanut genotypes by selection and breeding. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 58: 961–966.
402. Modirsanei, M., Mansoori, B., Khosravi, A.R., Kiaei, M.M., Khazraeinia, P., Farkhoy, M., and Masoumi, Z. (2008) Effect of diatomaceous earth on the performance and blood variables of broiler chicks during experimental aflatoxicosis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 626-632.
403. Moghadam, M.M., and Hokmabadi, H. (2010) Study on the effect of pistachio testa on the reduction of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B-1 production in kernels of different pistachio cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 4: 744-749.
404. Mohammadi, H., 2011. A Review of Aflatoxin M1, Milk, and Milk products. Chapter 19 In: *Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology* Edited by [Ramón Gerardo Guevara-González](#): 397 – 414.
405. Montagna, M.T., Ch. Napoli, O. De Giglio, R. Iatta and G. Barbuti (2008). Occurrence of Aflatoxin M1 in Dairy Products in Southern Italy. *Int. J. Mol. Sci.* (2008), 9: 2614-2621.
406. Montes, G.N., Reyes, M.C.A., Montes, R.N., and Cantu, A.M.A. (2009) Incidence of potentially toxigenic fungi in maize (*Zea mays* L.) grain used as food and animal feed. *Cyta-Journal of Food*, 7: 119-125.
407. Mortensen, G.K., Strobel, B.W., Hansen, H.C.B. (2003) Determination of zearalenone and ochratoxin A in soil. *Anal. Bioanal. Chem.*, 376: 98–101.
408. Moss, M.O. (1989) Mycotoxins of *Aspergillus* and other Filamentous Fungi. *Journal of Applied Bacteriology Symp. Suppl.*: 695-815.
409. Moss, M.O. (1998) Recent studies of mycotoxins. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*, 27: 62-76.
410. Movassagh Ghazani, M.H. (2009) Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Tabriz (northwest of Iran) *Food and Chemical Toxicology*, 7: 1624-1625.
411. Muller, T.E., Nyberg, M., (2004) Efficiency of different extraction solvent mixtures used in analyses of aflatoxins from a certified peanut meal reference material, *Food Addit. Contam.*, 21: 781–785.
412. Muriuki GK, Siboe GM. (1995) Maize flour contaminated with toxigenic fungi and mycotoxins in Kenya. *Afr J Health Sci.* 2: 236-241.
413. Narang, U., Gauger, P.R., Kusterbeck, A.W. and Ligler F.S., (1998) Multianalyte detection using a capillary-based flow immunosensor. *Anal. Biochem.* 255: 13–19

414. NAS, (1983) US National Academy of Science, Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process. National Academy Press, Washington, DC.
415. Nasir, M.S. and Jolley, M.E., (2003) Fluorescence polarization (FP) assays for the determination of grain mycotoxins (fumonisins, DON vomitoxin and aflatoxins), *Comb. Chem. High Thr. Scr.*, 6, 267–273.
416. Needham, L.L., Ozkaynak, H., Whyatt, R.M., Barr, D.B., Wang, R.Y., Naeher, L., Akland, G., Bahadori, T., Bradman, A., Fortmann, R., Liu, L.J., Morandi, M., O'Rourke, M.K., Thomas, K., Quackenboss, J., Ryan, P.B., Zartarian, V., (2005). Exposure assessment in the national children's study. *Environ. Health Perspect.* 113 (8): 1076–1082.
417. Nesci, A.V., Bluma, R.V., Etcheverry, M.G. (2005) In vitro selection of maize rhizobacteria to study potential biological control of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin production. *Eur. J. Plant Pathol.*, 113(2): 159-171.
418. Newberne, P.M.; Russo, R. and Wogan, G.N. (1966): "Acute toxicity of AFB1 in the dog." *Pathol. Vet.*, 3: 331-340.
419. Newell, J. (1983) Treatment for starvation may kill. *League for International Food Education Newsletter*, 16: 2-3.
420. Ngindu, A., Johnson, B.K., and Kenya, P.R. (1982) Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya, *The Lancet*, 319, Issue 8285: 1346-1348.
421. Nguyen, M.T., Tozovanu, M., Tran, T.L., and Pfohl-Leszkowicz, A. (2007) Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food Chemistry*, 105: 42-47.
422. Niehaus W.G. Jr. and Jiang W. (1989) Nitrate induces enzymes of the mannitol cycle and suppresses versicolorin synthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*, 107: 131–137.
423. Nielsen K.F., U. Thrane, J. (2001) Fast methods for trichothecenes in fungal cultures using gas chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 929: 75–87.
424. Nielsen, K.F., Smedsgaard, J. (2003) Fungal metabolite screening: Database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *J. Chromatogr. A*, 1002: 111–136.

425. Njobeh, P.B., Dutton, M.F., Koch, S.H., Chuturgoon, A., Stoev, S., and Seifert, K. (2009) Contamination with storage fungi of human food from Cameroon. *International Journal of Food Microbiology*, 135: 193-198.
426. Norton R.A. (1999) Inhibition of aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus* by anthocyanidins and related flavonoids, *J Agric Food Chem*, 47, 1230–1235.
427. Novas, M.V. and Cabral, D. (2002) Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus* from peanut in Argentina, *Plant Dis.*, 86(3): 215–219.
428. Nuntharatanapong, N., Suramana, T., Chaemthanorn, S., Zapuang, R., Ritta, E., Semathong, S., Chuamorn, S., Niyomwan, V., Dusitsin, N., Lohinavy, O. and Sinhaseni, P. (2001) Increase in tumour necrosis factor-alpha and a change in the lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in plasma of workers exposed to aflatoxin-contaminated feeds. *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, 52: 291–298.
429. Odhav, B., Mngadi, P.T., and Govinden, R. (2008) Co-occurring mycotoxins in animal feeds. *African Journal of Biotechnology*, 7: 2239-2243.
430. Odvody, G., Spencer, N., Remmers, J. (1997) A description of silk cut, a stress related loss of kernel integrity in preharvest maize. *Plant Disease*, 81: 439–444.
431. Oettle, A.G. (1965) The etiology of primary carcinoma of the liver in Africa: A critical appraisal of previous ideas with an outline of the mycotoxin hypothesis. *S. A. Tydskrif Vir Genees-kunde* 9 October: 817-825.
432. Olanya, O.M., Hoyos, G.M., Tiffany, L.H., and McGee, D.C. (1997) Waste corn as point source of inoculum for *Aspergillus flavus* in the corn agroecosystem, *Plant Dis.*, 81, 576–581.
433. Oliveira C. A. F., Rosmaninho J. F., Butkeraitis P., Correa B., Reis T. A., Guerra J. L., Albuquerque R. and Moro M.E.G. (2002) Effect of Low Levels of Dietary Aflatoxin B1 on Laying Japanese Quail. *Poultry Science* 81: 976-980.
434. Oliveira, C.A.F., Sebastiao, L.S., Fagundes, H., Rosim, R.E., and Fernandes, A.M. (2008) Aflatoxins and cyclopiazonic acid in feed and milk from dairy farms in Sao Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants Part B-Surveillance*, 1: 147-152.
435. Olsson J., T. Börjesson, T. Lundstedt, J. Schnürer, (2002) Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 203–214.

436. Onji, Y., Aoki, Y., Tani, N., Umebayashi, K., Kitada, Y., Dohi, Y. (1998) Direct analysis of several *Fusarium* mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 815: 59–65.
437. Ostry, V., Skarkova, J. (2000) Development of an HPTLC method for the determination of deoxynivalenol in cereal products. *JPC – J. Plan. Chromatogr. – Modern TLC*, 13: 443–446.
438. Overy D.P., Seifert K.A., Savard M.E., Frisvad J.C., (2003) *Spoilage fungi and their* mycotoxins in commercially marketed chestnuts. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 69-77.
439. Özdemir M. (2007) Determination of aflatoxin M 1 levels in goat milk consumed in Kilis province. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 54: 99-103.
440. Pal, A., Acharya, D., Saha, D., Roy, D., Dhar, T. K., (2005) In situ sample cleanup during immunoassay: A simple method for rapid detection of aflatoxin B1 in food samples, *J. Food Prot.*, 68: 2169–2177.
441. Pal, A., Dhar, T.K., (2004) An analytical device for on-site immunoassay, Demonstration of its applicability in semiquantitative detection of aflatoxin B1 in a batch of samples with ultrahigh sensitivity, *Anal. Chem.*, 76: 98–104.
442. Palumbo, J.D., Baker, J.L., Mahoney, N.E. (2006) Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds. *Microb. Ecol.*, 52(1):45-52.
443. Panangala, V.S. Giambrone, J.J., Diener, U.L., Davis, N.O., Hoerr, F.J., Mitra, A., Schultz, R.D., Wilt, G.R, (1986) Effects of aflatoxin on the growth performance and immune responses of weanling swine. *Am J Vet Res* 47: 2062-2067.
444. Papp, E., Otta, K.H., Záray, G., Mincsovcics, E. (2002) Liquid chromatographic determination of aflatoxins. *Microchem. J.*, 73: 39–46.
445. Park DL, Pohland AE (1986) A rationale for the control of aflatoxin in animal feeds. In: Steyn PS, Vleggaar R (eds) *Mycotoxins and Phycotoxins*. Presented at the 6th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Pretoria, Republic of South Africa, July 22-25, 1985. Elsevier Scientific Pub, Amsterdam, The Netherlands, pp 473-482.
446. Park, D.L. and Liang, B. (1993) Perspectives on aflatoxin control for human food and animal feed, *Trends in Food Science and Technology*, 4: 334-342.
447. Pasha, T.N., Farooq, M.U., Khattak, F.M., Jabbar, M.A., and Khan, A.D. (2007) Effectiveness of sodium bentonite and two commercial products as aflatoxin

- absorbents in diets for broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 132: 103-110.
448. Patel, S., Hazel, C.M., Winterton, A.G.M., and Mortby, E. (1996) Survey of ethnic foods for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 13: 833-841.
 449. Patterson, D.S.P. and Anderson, P.H. (1982) Recent aflatoxin feeding experiments in cattle. *Vet Rec* 110: 60.
 450. Payne, G.A. (1992) Aflatoxin in maize, *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 10(5): 423–440.
 451. Payne, G.A. (1992) Aflatoxin in maize, *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 10(5): 423–440.
 452. Payne, G.A. (1998) Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops, in *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, Sinha, K.K. and Bhatnagar, D., Eds., Marcel Dekker, New York: 279–306.
 453. Payne, G.A. and Brown, M.P. (1998) Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis, *Annu. Rev. Phyto-pathol.*, 36: 329-362.
 454. Payne, G.A., Hagler, W.M., and Adkins, C.R. (1988a) Aflatoxin accumulation in inoculated ears of field-grown maize, *Plant Dis*, 72: 422–424.
 455. Payne, G.A., Thompson, D.L., Lillehoj, E.B., Zuber, M.S., Adkins, C.R. (1988b) Effect of temperature on the preharvest infection of maize kernels by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 78: 1376–1380.
 456. Pazzi M, Medana C, Brussino M, Baiocchi C (2005) *Ann Chim* 95:803
 457. Peña, R., Alcaraz, M.C., Arce, L., Ríos, A., Valcárcel, M. (2002) Screening of aflatoxins in feed samples using a flow system coupled to capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 967: 303–314.
 458. Peterson, S.W. (1995) Phylogenetic analysis of *Aspergillus* sections *Cremeri* and *Wentii*, based on ribosomal DNA sequences, *Mycol. Res.*, 99: 1349–1355.
 459. Peterson, S.W. (2000) Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis, in *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*, Samson, R.A. and Pitt, J.I., Eds., Harwood Academic, Singapore: 323–355.
 460. Peterson, S.W., Ito, Y., Horn, B.W. and Goto, T. (2001) *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*, *Mycologia*, 93(4): 689–703.

461. Pettit, R.E. and Taber, R.A. (1968) Factors influencing aflatoxin accumulation in peanut kernels and the associated mycoflora. *Applied Microbiology*, 16: 1230–1234.
462. Pharmacopeia, E. (2007) Determination of aflatoxin B1 in herbal drugs. In *European Pharmacopeia* (6 ed.) Strasbourg Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare of the Council of Europe (EDQM).
463. Phillips, S.I., P.W. Wareing, D. Ambika, S. Panigrahi and V. Medlock (1996) The mycoflora and incidence of aflatoxin, zearalenone and sterigmatocystin in dairy feed and forage samples from Eastern India and Bangladesh. *Mycopathologia*, 133: 15-21
464. Phillips, T.D., Lemke, S.L., and Grant, P.G. (2002) Characterization of clay-based enterosorbents for the prevention of aflatoxicosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 504: 157–171.
465. Pier, A.C. (1981) Mycotoxins and animal health. *Adv Vet Sci Comp Med* 25: 185-243.
466. Pier, A.C. (1992) Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *Journal of Animal Science*, 70(12): 3964-3967.
467. Pier, A.C. and Heddlestone, K.L. (1970) The effect of aflatoxin on immunity on turkeys. I. Impairment of actively acquired resistance to bacterial challenge. *Avian Dis* 14: 797-809.
468. Pier, A.C., McLoughlin, M.E. (1985) Mycotoxic suppression of immunity. In: Lacey J. (ed) *Trichothecenes and Other Mycotoxins*. Wiley, New York, pp 507-519.
469. Pier, A.C., McLoughlin, M.E. (1985) Mycotoxic suppression of immunity. In: Lacey J. (ed) *Trichothecenes and Other Mycotoxins*. Wiley, New York, pp 507-519.
470. Pier, A.C., McLoughlin, M.E., Richard, J.L., Baetz, A., Dahlgren, R.R. (1985) *In utero* transfer of aflatoxin and selected effects ,in neonatal pigs. In: Lacey J (ed) *Trichothecenes and Other Mycotoxins*. Wiley, New York, pp 495-506.
471. Pierezan, F., Oliveira, J.C., Carmo, P.M., Lucena, R.B., Rissi, D.R., Togni, M., and Barros, C.S.L. (2010) Outbreak of aflatoxicosis in calves in southern Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 30: 418-422.
472. Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (2006) Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia*, 162(3): 233-243.

473. Pittet, A. (1998) Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an update review. *Revue De Medecine Veterinaire*, 149: 479–492.
474. Placinta, C.M., J.P.F. D'Mello and A.M.C. Macdeoxynivalenolald, (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 78: 21-37.
475. Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M. and Piva, G. (2009) On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Review. Food and Chemical Toxicology*, 47(5): 984-991.
476. Prasad, T., Sinha, R.K. and Jeswal, P. (1987) Seed mycoflora of cereals and aflatoxin contamination under storage systems. *J. Indian Bot. Soc.*, 66: 156–160.
477. Proctor, A.D., Ahmedna, M., Kumar, J.V., and Goktepe, I. (2004) Degradation of aflatoxins in peanut kernels/flour by gaseous ozonation and mild heat treatment. *Food Additives and Contaminants*, 21: 786-793.
478. Prvulovic, D., Kojic, D., Grubor-Lajsic, G., and Kosarcic, S. (2008) The effects of dietary inclusion of hydrated aluminosilicate on performance and biochemical parameters of broiler chickens. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 32: 183-189.
479. Pussemier, L., Pierard, J.Y., Anselme, M., Tangni, E.K., Motte, J.C., Larondelle, Y. (2006) Development and application of analytical methods for the determination of mycotoxins in organic and conventional wheat. *Food Addit. Contam.*, 23: 1208–1218.
480. Qin, G., Gopalan-Kriczky, P., Su, J., Ning, Y., and Lotlikar, P.D. (1997) Inhibition of aflatoxin B1-induced initiation of hepatocarcinogenesis in the rat by green tea. *Cancer Lett.* 112: 149–154.
481. Railey J., H George Mandel, H.G, Subatra Sinha, David L Judahand and Gordon E Neal. (1997) In vitro activation of human Harvey -ras Proto Onco gene by aflatoxin b1. *Carcinogenesis*. Vol 18 pp 905-910 .
482. Ramos-Gomez, M., Kwak, M.K., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., and Kensler, T.W. (2001) Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in *nrf2* transcription factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 3410–3415.
483. Ranjan, K.S. and A.K. Sinha, (1991). Occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in animal feed from Bihar, India. *J. Sci. Food Agric.*, 56: 39-47.

484. Raper, K.B. and Fennell, D.I. (1965): "The Genus *Aspergillus*", The Williams and Wilkins Co., Baltimore U.S.A.
485. RASFF. (2011) RASFF portal. In DG SANCO
<https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/>
486. Ratcliff, J., (2002). The Role of Mycotoxins in Food and Feed Safety. Presented at AFMA (Animal Feed Manufacturers Association, South Africa) meeting on 16 August 2002 Available from : <http://www.facs.org.uk>
487. Razzazi-Fazeli, E., Noviandi, C.T., Porasuphatana, S., Agus, A., Bhm, J., (2004) A survey of aflatoxin B1 and total aflatoxin contamination in baby food, peanut and corn products sold at retail in Indonesia analysed by ELISA and HPLC, *Mycot. Res.*, 20: 51–58.
488. Razzazi-Fazeli, E., Rabus, B., Cecon, B., Böhm, J. (2002) Simultaneous quantification of A-trichothecene mycotoxins in grains using liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 968: 129–142.
489. Reddy, B.N. and Raghavender, C.R. (2007) Outbreaks of aflatoxicoses in India-African. *Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 7(5).
490. Reddy, K.R.N., Reddy, C.S., Abbas, H.K., Abel, C.A., and Muralidharan, K. (2008) Mycotoxigenic Fungi, Mycotoxins, and Management of Rice Grains. *Toxin Reviews*, 27: 287-317.
491. Reddy, S.V. and Waliyar, F. (2000) Properties of aflatoxin and its producing fungi. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, <http://www.icrisat.org/aflatoxin/aflatoxin.asp>
492. Rees, N. and Tennant, D., (1994) Estimation of food chemical intake. In: Kostsonis, F.N., Mackey, M., Hjeelle, J. (Eds.), *Nutritional Toxicology*. Raven Press, New York: 199–221.
493. Resnik, M.S., L. Costarrica, and A. Pacin, (1995) Mycotoxins in Latin America and the Caribbean. *Food Control*, 6(1): 19-28.
494. Ribeiro, J.M.M., Cavaglieri, L.R., Vital, H.D., Kruger, C.D., and Rosa, C.A.D. (2009) Gamma radiation on the mycoflora of poultry feed and *Aspergillus* species. *Ciencia Rural*, 39: 1452-1458.
495. Ricci, R., Sartori, A., Palagiano, C., and Zotte, A.D. (2010) Study on the Nutrient Adequacy of Feeds for Pet Rabbits Available in the Italian Market. *World Rabbit Science*, 18: 131-137.

496. Richard, J.L. (1991) Mycotoxins as immunomodulators in animal systems. In: Bray GA, Ryan DH (eds) Mycotoxins, Cancer, and Health. Pennington Nutrition Series, Louisiana State Univ Press, Baton Rouge, LA, pp 197-220.
497. Richard, J.L. Pier, A.C., Stubblefield, R.D., Shotwell, O.L., Lyon, R.L., Cutlip, R.C. (1983). Effect of feeding corn naturally contaminated with aflatoxin on feed efficiency, on physiologic, immunologic, and pathologic changes, and on tissue residue in steers. Am J Vet Res 44: 1294-1299.
498. Richard, J.L., Stubblefield, R.D., Lyon, R.L., Peden, W.M., Thurston, J.R., Rimier, R.B. (1986) Distribution and clearance of aflatoxins BI and M1 in turkeys fed diets containing 50 or 150 ppb aflatoxins from naturally contaminated com. Avian Dis 30: 788-793.
499. Richard, J.L., Thurston, J.R. (1975) Effect of aflatoxin on phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* spores by rabbit alveolar macrophages. Appl Microbiol 30: 44-77.
500. Richard, J.L., Thurston, J.R., Pier, A.C. (1978) Effects of mycotoxins on immunity. In: Rosenberg P (ed) Toxins: Animal, Plant, and Microbial. Pergamon Press, New York, pp 801-817
501. Rigo, K., Varga, J., Toth, B., Teren, J., Mesterhazy, A. and Kozakiewicz, Z. (2002) Evolutionary relationships within *Aspergillus* section *Flavi* based on sequences of the intergenic transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene, J. Gen. Appl. Microbiol., 48(1): 9–16.
502. Rivka Barkai-Golan, N.P. (2008) Mycotoxins in fruits and vegetables. In. Burlington Academic Press, 978-0-12-374126-4
503. Rizzi L., Simioli M., Roncada P. and Zaghini A. (2003) Aflatoxin B1 and clinoptilolite in feed for laying hens. Effect on egg quality, mycotoxin residues in livers and hepatic mixed function oxidase activities. Journal of Food Protection, 66: 860–865.
504. Robens JF and Richard JL. (1992). Aflatoxins in animal and human health. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 127 : 69-94.
505. Robens, J., Cardwell, K.F. (2003) The costs of mycotoxin management to the USA: management of aflatoxins in the United States. Journal of Toxicology. Toxin Reviews, 22: 139–152.

506. Roch O.G., Blunden G., Coker R.D., Nawaz S., (1995) The validation of a solid phase clean-up procedure for the analysis of aflatoxins in groundnut cake using HPLC. *Food Chem.* 52: 93-98.
507. Rodricks, J.V. and Stoloff, L. (1977) *Mycotoxins in human and animal health.* Pathotox publishers, Park Forest South, 1L: 67-69.
508. Roebuck, B.D., Liu, Y.L., Rogers, A.E., Groopman, J.D., and Kensler, T.W. (1991) Protection against aflatoxin B₁-induced hepatocarcinogenesis in F344 rats by 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiole-3-thione (oltipraz): predictive role for short-term molecular dosimetry. *Cancer Res.* 51: 5501–5506.
509. Romagnoli, B., Menna, V., Gruppioni, N., and Bergamini, C. (2007) Aflatoxins in spices, aromatic herbs, herb-teas and medicinal plants marketed in Italy. *Food Control*, 18: 697-701.
510. Roussi V., Govaris A., Varagouli A., Botsoglou N.A., (2002). Occurrence of aflatoxin M₁ in raw and market milk commercialized in Greece. *Food Addit Contam.*, 19(9): 863-8.
511. Rowe-Taitt, C.A., Golden, J.P., Feldstein, M.J., Cras, J.J., Hoffman, K.E., and Ligler, F.S., (2000) Array biosensor for detection of biohazards, *Biosen. Bioelect.*, 14: 785–794.
512. Roy, A.K., Sinha, K.K., and Chourasia, H. K. (1988) Aflatoxin Contamination of Some Common-Drug Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 842-843.
513. Royes, J.B. & Yanong, R.P. (2002) *Molds in fish feeds and aflatoxicosis.* Copyright by the University of Florida, *Institute of Agric. Sci.* (UF/ IFAS).
514. Rucker, K.S., Kvien, C.K., Holbrook, C.C., and Hook, J.E. (1995) Identification of peanut genotypes with improved drought avoidance traits, *Peanut Sci.*, 21: 14–18.
515. Rumbeiha, W. (2001): "Mycotoxigenesis in pets. DCPAH-Newsletter" Vol. 18 No 2.
516. Russel, L., Cox D.F., Larsen G., Bodwell K. and Nelson E.E. (1991). Incidence of molds and mycotoxins in commercial animal feed mills in seven Midwestern States. *J. Anim. Sci.*, 69: 5-12.
517. Rustemeyer, S.M., Lamberson, W.R., Ledoux, D.R., Rottinghaus, G.E., Shaw, D. P., Cockrum, R.R., Kessler, K.L., Austin, K.J., and Cammack, K.M. (2010)

- Effects of dietary aflatoxin on the health and performance of growing barrows. *Journal of Animal Science*, 88: 3624-3630.
518. Rustom, I.Y.S. (1997) Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59: 57-67.
 519. Saleemullah A.I., Khalil I.A., Shah H. (2006) Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. *Food Chemistry*, 98: 699-703.
 520. Sales, A.C., and Yoshizawa, T. (2006) *Aspergillus section flavi* and aflatoxins in dusts generated by agricultural processing facilities in the philippines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(15): 2534-2542.
 521. Salwa A. and Anwer W. (2009) Effect of Naturally Contaminated Feed with Aflatoxins on Performance of Laying Hens and the Carryover of Aflatoxin B₁ Residues in Table Eggs. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8: 181-186.
 522. Samson, R.A. (2001) Current fungal taxonomy and mycotoxins, in *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium*, de Koe, W.J. et al., Eds., Ponsen and Looyen, Wageningen, The Netherlands.
 523. Sanders, T.H., Blankenship, P.D., Cole, R.J. and Hill, R.A. (1984) Effect of soil temperature and drought on peanut pod and stem temperatures relative to *Aspergillus flavus* invasion and aflatoxin contamination, *Mycopathologia*, 86: 51–54.
 524. Sanders, T.H., Cole, R.J., Blankenship, P.D., and Dorner, J.W. (1993) Aflatoxin contamination of peanut from plants drought stressed in pod or root zones, *Peanut Sci.*, 20, 5–8, 1993.
 525. Sargeant, K., Sheridan, A., O’Kelly, J. and Carnaghan, R.B.A. (1961) Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*, 192, 1095-1097.
 526. Sargeant, K.; Carraghan, R.B. and Allcroft, R. (1963): "Toxic products in groundnuts. Chemistry and origin." *Chem. And Ind.*: 53-55.
 527. Schollenberger, M., Lauber, U., Terry Jara, H., Suchy, S., Drochner, W., Müller, H.-M. (1998) Determination of eight trichothecenes by gas chromatography mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A*, 815: 123–132.
 528. Schothorst, R.C., Jekel, A.A. (2001) Determination of trichothecenes in wheat by capillary gas chromatography with flame ionisation detection. *Food Chem.*, 73: 111–117.

529. Schroeder, H.W. and Verrett, M.J. (1969) Production of aflatoxin by *Aspergillus wentii* Wehmer, Can. J. Microbiol., 15, 895–898.
530. Scott P.M., (1995) Mycotoxin methodology. *Food Addit. Contam.* 12: 395–403
531. Scott, P.M., (1993) Recent developments in methods of analysis for mycotoxins in foodstuffs, *TrAC Trends Analyt. Chem.*, 12: 382–386.
532. Selim, M.I., A.M. Juchems and W. Pependorf. (1998). Assessing airborne aflatoxin B1 during on-farm grain handling activities. *Am Ind Hyg Assoc J* 59(4): 252-6.
533. Senyuva H.Z., Gilbert J. (2005) Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in hazelnut paste: interlaboratory study. *J AOAC Int*, 88: 526-535.
534. Seo, J.H., Min, W.K., Kweon, D.H., Park, K., and Park, Y.C. (2011) Characterisation of monoclonal antibody against aflatoxin B(1) produced in hybridoma 2C12 and its single-chain variable fragment expressed in recombinant *Escherichia coli*. *Food Chemistry*, 126: 1316-1323.
535. Serck-Hanssen, A. (1970) Aflatoxin-induced fatal hepatitis. A case report from Uganda. *Arch. Environ Health*, 20: 729.
536. Serra, R., Mendonça, C., Abrunhosa, L., Pietri, A., Venancio, A. (2004) Determination of ochratoxin A in wine grapes: Comparison of extraction procedures and method validation. *Anal. Chim. Acta*, 513: 41–47.
537. Set, E., and Erkmen, O. (2010) The aflatoxin contamination of ground red pepper and pistachio nuts sold in Turkey. *Food Chem Toxicol*, 48: 2532-2537.
538. Sewram, V., Shephard, G.S., van der Merwe, L., and Jacobs, T.V. (2006) Mycotoxin contamination of dietary and medicinal wild plants in the Eastern Cape Province of South Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 5688- 5693.
539. Sforza, S., Dall'Asta, C., Marchelli, R. (2006) Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, 25: 54–76.
540. Shalkop, W.T. and Armbrecht, B.H. (1974) Carcinogenic response of brood sows fed aflatoxin for 28 to 30 months. *Am J Vet Res* 35: 623-627.
541. Shane, S.H., (1994) Economic Issues Associated with Aflatoxins. In: *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural*

- Significance, Eaton, D.L. and J.D. Groopman (Eds.) Academic Press, San Diego: 513-527.
542. Shank, R.C. (1977) Epidemiology of aflatoxin carcinogenesis. *Adv Mod Toxicol*, 3: 291-318.
 543. Sharlin, J.S., Howarth, B.Jr. and Wyatt, R.D. (1980): "Effect of dietary aflatoxin on serum characteristics of mature broiler breeder males." *Poult. Sci.*, 59: 1311.
 544. Shaw, R.H. (1977) Climatic requirement, in *Corn and Corn Improvement*, Sprague, G.F., Ed., American Society of Agronomy, Madison, WI: 591.
 545. Shearer, J.F., Sweets, L.E., Baker, N.K., Tiffany, L.H. (1992) A Study of *Aspergillus flavus* *Aspergillus parasiticus* in Iowa Crop Fields—1988–1990. *Plant Disease*, 76: 19–22.
 546. Shenasi, M., Aidoo, K. E., and Candlish, A. A. G. (2002) Microflora of date fruits and production of aflatoxins at various stages of maturation. *International Journal of Food Microbiology*, 79: 113-119.
 547. Shephard G.S. (2008) Risk assessment of aflatoxins in food in Africa, *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 25:10, 1246-1256.
 548. Shephard, G.S., van der Westhuizen, L., Gatyeni, P.M., Katerere, D.R., Marasas, W.F.O. (2005) Do fumonisin mycotoxins occur in wheat? *J. Agric. Food Chem.*, 53: 9293–9296.
 549. Shephard, G.S.. (2003) Aflatoxin and food safety: recent African perspectives. *Toxin Rev* 22: 267.
 550. Sherif, O.S. (2006) Mycotoxins and child health: the risk analysis paradigm. *Med. J. Cairo Univ.* 74: 339–365.
 551. Shim W.B., Kolosova A.Y., Kim Y., Yang Z.Y., Park S.J., Eremin S.A., Lee I.S., Chung D.H. (2004) Fluorescence polarization immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of ochratoxin A. *Int J Food Sci Technol* 39: 829–837.
 552. Shimada, T., Guengrich, F.P. (1989) Evidence for cytochrome P-450-N-F the nifedipine oxidase being the principal enzyme involved in the bioactivation of aflatoxins in human liver. *Proc Natl Acad Sci* 86: 462-465.
 553. Sibanda, L., De Saeger, S., Van Peteghem, C. (2002) Optimization of solid-phase clean-up prior to liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in roasted coffee. *J. Chromatogr. A*, 959: 327–330.

554. Siebold, H.R., Baliley, W.S. (1952) An epizootic of hepatitis in the dog. *J Am Vet Med Assoc.* 121(906): 201-206.
555. Simonich, M.T., Egner, P., Roebuck, B.D., Orner, G., Jubert, C., Pereira, C., Groopman, J.D., Kensler, T.W., Dashwood, R.H., Williams, D., et al. (2007) Natural chlorophyll inhibits aflatoxin B1 induced multi-organ carcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis* 28: 1294–1302.
556. Sims, S.R., Pershing, J.C., and Reich, B.J. (1996) Field evaluation of transgenic corn containing a *Bacillus thuringiensis* Berliner insecticidal protein gene against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): *J. Entomol. Sci.*, 31: 340–346.
557. Sinnhuber, R.O., Hendricks, J.D., Wales, J.H. and Putnam, G.B. (1977) Neoplasms in rainbow trout, a sensitive animal model for environmental carcinogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 298, Aquatic pollutants and biological effects with emphasis on neoplasia: 389-408.
558. Sisk, D.B. and Carlton, W.W. (1972) Effect of dietary protein concentration on response. *Am J Vet Res* 33: 107-114.
559. Sisson, P.F. (1987) The effect of climatic conditions on the incidence and severity of aflatoxin in the USA, in *Aflatoxin in Maize*, Zuber, M.S., Lillehoj, E.B., and Renfro, B.L., Eds., CIMMYT, Mexico: 172–177.
560. Skrinjar, M.,M. Danev and G. Dimic, (1995) Investigation on the presence of toxigenic fungi and aflatoxins in raw milk. *Acta Alimentaria*, 24: 395-402.
561. Smela M.E. and Curier S.S. (2001) Elisabeth A Bailey and John M Essingmann: The chemistry and biology of aflatoxin B1, *Carcinogenesis.* 22 4: 535-545.
562. Smiley, R.D., and Draughon, F.A. (2000) Preliminary evidence that degradation of aflatoxin B1 by *Flavobacterium aurantiacum* is enzymatic. *J Food Prot*, 63: 415-418.
563. Smith, T.K. and I.R. Seddon, (1998). Toxicological Synergism between *Fusarium* Mycotoxins in Feeds. In: *Biotechnology in the Feed Industry*. Lyons, T.P. and K.A. Jacques, (Eds.) Nottingham University Press, Loughborough, UK: 257-269.
564. Sobolev, V.S., Dorner, J.W., (2002) Cleanup procedure for determination of aflatoxins in major agricultural commodities by liquid chromatography, *J. AOAC Int.*, 85: 642 –645.
565. Sokolović, M., Šimpraga, B. (2006) Survey of trichothecene mycotoxins in grains and animal feed in Croatia by thin layer chromatography. *Food. Control* 17: 733-740 .

566. Sørensen, J.L., Nielsen, K.F., Thrane, U. (2007) Analysis of moniliformin in maize plants using hydrophilic interaction chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 9764–9768.
567. Sorenson, W.G., Hesseltine, C.W., and Shotwell, O.L. (1967) Effect of temperature on production of aflatoxin on rice by *Aspergillus flavus*, *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 33: 49.
568. Sorenson, W.G., Jones, W., Simpson, J. and Davidson, J.I. (1984) Aflatoxin in respirable airborne peanut dust, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Vol.14, pages 525-533.
569. Southern, L.L. and Clawson, A.J. (1979) Effects of aflatoxins on finishing swine. *J An Sci* 49:1006-101 I.
570. Souza, E.L., Vilar, E.A., Stamford, T.L. M., Bastos, S.T.G., and Filho, E.V.C. (2008) Short communication. Total aflatoxin and ochratoxin A in the liver, kidneys and plasma of experimentally contaminated chickens. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6: 373-377.
571. Spanjer, M.C., Rensen, P.M., Scholten, J.M. (2008) LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Addit. Contam.*, 25: 472–489.
572. Spanjer, M.C., Scholten, J.M., Kastrup, S., Jorissen, U., et al., (2006) Sample comminution for mycotoxin analysis: Drymilling or slurry mixing? *Food Addit. Contam.*, 23: 73 –83.
573. Stack, J.P. and Pettit, P.E. (1984) Germination of *Aspergillus flavus* sclerotia in soil, *Phytopathology*, 74: 799.
574. Stewart, D. and Larson, E. (2002) *Aflatoxicosis in wildlife*. Information Sheet 1582 Mississippi State Univ. Extension Service., Cooperating with U.S. Dept. Of Agriculture.
575. Stoloff, L. and Lillehoj, E.B. (1981) Effect of genotype (open pollinated vs. hybrid) and environment on preharvest aflatoxin contamination of maize grown in southeastern United States, *J. AOCS*, 58: 976–980.
576. Stone, R. (2002) Biodefense: peering into the shadows — Iraq’s bioweapons program, *Science*, 297(5584): 1110–1112.
577. Stroka J., Anklam E., Joerissen U. and Gilbert J. (2001) Determination of aflatoxin B1 in baby food (infant formula) by immunoaffinity column cleanup

- liquid chromatography with postcolumn bromination: collaborative study. *J AOAC Int* 84: 1116-1123.
578. Stroka J., Anklaam E., Jörissen U., Gilbert J. (2000) Immunoaffinity cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study *J AOAC Int* 83: 320-340.
 579. Stroka J., Anklaam E., Jörissen U., Gilbert J. (2000a) Immunoaffinity cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study *J AOAC Int* 83: 320-340.
 580. Stroka J., Petz M., Anklaam E. (2000) 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* 16: 23-42.
 581. Stroka, J. and Anklaam, E. (2000) Development of a simplified densitometer for the determination of aflatoxins by thin-layer chromatography, *Journal of Chromatography A*, 904: 263-268.
 582. Stroka, J. and Anklaam, E. (2000) Development of a simplified densitometer for the determination of aflatoxins by thin-layer chromatography, *Journal of Chromatography A*, 904: 263-268.
 583. Stroka, J., van Otterdijk, R., Anklaam, E. (2000b) Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. *J. Chromatogr. A*, 904, 251–256.
 584. Strosnider, H., Azziz-Baumgartner, E., Banziger, M., Bhat, R.V., Breiman, R., Brune, M.N., DeCock, K., Dilley, A., Groopman, J., Hell, K., Henry, S.H., Jeffers, D., Jolly, C., Jolly, P., Kibata, G.N., Lewis, L., Liu, X., Lubber, G., McCoy, L., Mensah, P., Miraglia, M., Misore, A., Njapau, H., Ong, C.N., Onsongo, M.T.K., Page, S.W., Park, D., Patel, M., Phillips, T., Pineiro, M., Pronczuk, J., Rogers, H.S., Rubin, C., Sabino, M., Schaafsma, A., Shephard, G., Stroka, J., Wild, C., Williams, J.T. and Wilson, D. (2006) Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environmental Health Perspectives*, 114(12): 1898-1903.
 585. Sugita-Konishi, Y., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Aoyama, K., Fujita, K., Kai, S., and Kumagai, S. (2006) Occurrence

- of aflatoxins, ochratoxin A, and fumonisins in retail foods in Japan. *Journal of Food Protection*, 69: 1365-1370.
586. Sulyok M., Krska R., Schuhmacher R. (2007) A liquid chromatography-tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples *Anal Bioanal Chem* 389: 1505 – 1523.
 587. Sydenham E.W., Shephard G.S. (1996) Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins. In: Gilbert J ed. *Progress in food contaminant analysis*. London, Blackie, pp 65-146.
 588. Tajkarimi, M., Aliabadi-Sh, F., Nejad, A.S., Poursoltani, H., Motallebi, A.A., and Mahdavi, H. (2008) Aflatoxin M-1 contamination in winter and summer milk in 14 states in Iran. *Food Control*, 19: 1033-1036.
 589. Tajkarimi, M., Shojae Aliabadi, F., Salah Nejad, M., Poursoltani, H., Motallebi, A.A., and Mahdavi, H. (2007) Seasonal study of aflatoxin M1 contamination in milk in five regions in Iran. *Int J Food Microbiol*, 116: 346-349.
 590. [Takino M.](#), [Tanaka T.](#), [Yamaguchi K.](#), [Nakahara T.](#). (2004) Atmospheric pressure photo-ionization liquid chromatography/mass spectrometric determination of aflatoxins in food. [Food Addit Contam.](#), 21(1):76-84.
 591. Takino, M., Daishima, S., Nakahara, T. (2003) Liquid chromatography/mass spectrometric determination of patulin in apple juice using atmospheric pressure photoionization. *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 17: 1965–1972.
 592. Tamura, M., Kawahara, K. and Sugiyama, J. (2000) Molecular phylogeny of *Aspergillus* and associated teleomorphs in the Trichocomaceae (Eurotiales): in *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*, Samson, R.A. and Pitt, J.I., Eds., Harwood Academic, Singapore: 357–372.
 593. Tang, L., Tang, M., Xu, L., Luo, H., Huang, T., Yu, J., Zhang, L., Gao, W., Cox, S. B., and Wang, J. S. (2008) Modulation of aflatoxin biomarkers in human blood and urine by green tea polyphenols intervention. *Carcinogenesis* 29: 411–417.
 594. Tassaneeyakul, W., Razzazi-Fazeli, E., Porasuphatana, S., and Bohm, J. (2004) Contamination of aflatoxins in herbal medicinal products in Thailand. *Mycopathologia*, 158: 239-244.
 595. Taubenhaus, J.J. (1920) A Study of the Black and Yellow Molds of Ear Corn, Texas Agricultural Experiment Station, Bulletin 270: 1-38.

596. Tavcar-Kalcher, G., Vrtac, K., Pestevesek, U., Vengust, A., (2007) Validation of the procedure for the determination of aflatoxin B1 in animal liver using immunoaffinity columns and liquid chromatography with postcolumn derivatisation and fluorescence detection, *Food Control*, 18: 333–337.
597. Tedesco, D., Barbieri C., Lugano S. and Garavaglia L. (2008) Aflatoxin contamination risk: Bioactive natural compounds for animal health and healthy food. In B. F. A. Y. Sinyavskiy, ed. *Impact of pollution on Animal Products.*: 177-184.
598. Tejada-Castaneda, Z. I., Avila-Gonzalez, E., Casaubon-Huguenin, M.T., Cervantes-Olivares, R.A., Vasquez-Pelaez, C., Hernandez-Baumgarten, E.M., and Moreno-Martinez, E. (2008) Biodetoxification of aflatoxin-contaminated chick feed. *Poultry Science*, 87: 1569-1576.
599. Tekinsen, K. and Ucar, G. (2008) Aflatoxin M1 levels in butter and cream cheese consumed in Turkey. *Food Control*, 19: 27-30.
600. Tessari, E.N., Oliveira, C.A., Cardoso, A.I., Ledoux, D.R. and Rottinghaus, G.E. (2006) Effects of aflatoxin B1 and fumonisin B1 on body weight, antibody titres and histology of broiler chicks. *Br. Poult. Sci.*, 47(3): 357–364.
601. Thakur, C., Kumar, B.K., Reddy, A.G., Reddy, A.R., and Reddy, Y.N. (2008) Antioxidant and immunomodulatory effect of chlorophyllin on induced aflatoxicosis in broilers. *Indian Journal of Animal Sciences*, 78: 696-699.
602. Thapar G.S. (1988) Metabolite behaviour of aflatoxin producing strain and nontoxigenic strain of *Aspergillus flavus* to different sources of nitrogen and glucose concentration, *Mycopathologia*, 102: 9–12.
603. Thieu, N.Q., Ogle, B., Pettersson, H., (2008) Screening of Aflatoxins and Zearalenone in feedstuffs and complete feeds for pigs in Southern Vietnam, *Trop. Anim. Health Prod.*, 40: 77–83.
604. Thompson, D.L., Lillehoj, E.B., Leonard, K.J., Kwolek, W.F., and Zuber, M.S. (1980) Aflatoxin concentration in corn as influenced by kernel development stage and post-inoculation temperature in controlled environments, *Crop Sci.*, 20: 609–612.
605. Thompson, K.M., (2004) Changes in children's exposure as a function of age and the relevance of age definitions for exposure and health risk assessment. *Medscape Gen. Med.*, 6(3): 2–6.

606. Thomson, S.V. and Mehdy, M.C. (1978) Occurrence of *Aspergillus flavus* in pistachio nuts prior to harvest, *Phytopathology*, 68: 1112–1114.
607. Thornburg, L.P. and Raisbeck, M.F. (1988): "A study of canine hepatobiliary disease. Part 9: hemolytic disease, mycotoxicosis and pregnancy toxemia in the bitch." *Comp. Anim. Pract.*, 2: 13-17
608. Thurston, J.R., Richard, J.L., Cysewski, S.J., Pier, A.C., Graham, C.K. (1972) Effect of aflatoxin on complement activity in guinea pigs. *Proc Soc Exp Bioi Med*, 138: 300-303.
609. Tomlins, K.I., Jewers, K, Coker RD and Nagler M.J. (1989) A Bi-Directional Hptlc Development Method for the Detection of Low Levels of Aflatoxin in Maize Extracts. *Chromatographia*, 27: 49-52.
610. Trail, F., Mahanti, N., Rarick, M., Mehig, R., Liang, S.H., Zhou, R. and Linz, J.E. (1995) Physical and transcriptional map of an aflatoxin gene cluster in *Aspergillus parasiticus* and functional disruption of a gene involved early in the aflatoxin pathway. *Appl Environ Microbiol*, 61: 2665–2673.
611. Trucksess, M.W., and Scott, P.M. (2008) Mycotoxins in botanicals and dried fruits: A review. *Food Additives and Contaminants*, 25: 181-192.
612. Trucksess, M.W., Stack, M.E., (1994) Enzyme-linked immunosorbent assay of total aflatoxins B1, B2, and G1 in corn: Follow-up collaborative study, *J. AOAC Int.*, 77: 655–658.
613. Trucksess, M.W., Stoloff, L. & Young, K. (1983). Aflaoxicol and aflatoxins B1 and M1 in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin contaminated feed. *Poult. Sci.*, 62: 2176-2182.
614. Trung, T.S., Tabuc, C., Bailly, S., Querin, A., Guerre, P., and Bailly, J.D. (2008) Fungal mycoflora and contamination of maize from Vietnam with aflatoxin B(1) and fumonisin B(1) *World Mycotoxin Journal*, 1: 87-94.
615. Tsao, R. and Zhou, T., (2000) Micellar electrokinetic capillary electrophoresis for rapid analysis of patulin in apple cider, *J. Agric. Food Chem.*, 48: 5231–5235.
616. Tuomi, T., Saarinen, L., Reijula, K. (1998) Detection of polar and macrocyclic trichothecene mycotoxins from indoor environments. *Analyst*, 123: 1835–1841.
617. Uegaki, R., Tsukiboshi, T., and Cai, Y.M. (2010) *Aspergillus flavus* Producing Aflatoxins Isolated from Materials of Commercial Feed in Japan. *Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly*, 44: 421-427.

618. Uegaki, R., Tsukiboshi, T., and Cai, Y.M. (2010) *Aspergillus flavus* Producing Aflatoxins Isolated from Materials of Commercial Feed in Japan. *Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly*, 44: 421-427.
619. Upadhaya, S.D., Park, M.A., and Ha, J.K. (2010) Mycotoxins and Their Biotransformation in the Rumen: A Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23: 1250-1260.
620. Valdivia, A.G., Martinez-de-Anda, A., Jaramillo-Juarez, F., Reyes, J.L., Ortiz, R., Quezada, T., de Luna, M.C., and Rodriguez, M.L. (2010) Effects of aflatoxin chronic intoxication in renal function of laying hens. *Poultry Science*, 89: 1622-1628.
621. Van der Gaag B., Spath S., Dietrich H., Stigter E., Boonzaaijer G., van Osenbruggen T., Koopal K. (2003) Biosensors and multiple mycotoxin analysis. *Food Control* 14: 251–254.
622. Van Dijk, H.J., O'Dell, G.O., Bodine, A.B. (1984) Effects of aflatoxin M₁ intake, its physiologic levels on newborn dairy calves. *Am J Vet Res* 45: 1994-1997.
623. Van Dorp, D.A., Van Der Zijden, A.S.M., Beerthuis, R.K., Sparreboom, S., Ord, W.O., De jong, K. and Keuning, R. (1963) Dihydroaflatoxin B, a metabolite of *Aspergillus flavus*, Remarks on the structure of aflatoxin B, *Rec. Trav. Chim*, 82: 587-592.
624. Van Egmond H.B. and Jonker M.A. (2004) Current situation on regulation for mycotoxins. In: T. Yoshizawa, S. Kumagai, and T. Goto (Eds.): *New horizon of mycotoxicology for assuring food safety*. Tokyo: Japanese Association of Mycotoxicology: 1-15.
625. Van Egmond, H.P. (1989) Aflatoxin M₁: occurrence, toxicity, regulation, In: *Mycotoxins in Dairy Products*, (11-55): Elsevier Applied Science, New York.
626. Van Egmond, H.P., Jonker, M.A. (2003) Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed. The situation in 2002. Draft FAO Food and Nutrition Paper. National Institute for Public health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.
627. Varga, J., Rigo, K., Toth, B., Teren, J. and Kozakiewicz, Z. (2003) Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins, *Food Technol. Biotechnol.*, 41(1): 29–36.

628. Vargas, E.A., Preis, R.A., Castro, L., and Silva, C.M. (2001) Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, G2, zearalenone and fumonisin B1 in Brazilian corn. *Food Addit Contam*, 18: 981-986.
629. Vasanthi, S. and R.V. Bhat (1998) Mycotoxins in foods-occurrence, health and economic significance and food control measures. *Indian J. Med. Res.*, 108: 212-224.
630. Veldman A., Meijjs J.A.C., Borggreve G.J. and Heeres-van der Tol J.J. (1992) Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. *Journal of Animal Production*, 55: 163-168.
631. Verger, P.K., Vlatier, J.-L. and Dufour, A. (1999) [Estimation of theoretic intake of aflatoxins and ochratoxin.] In: Pfohl-Leszkowicz, A., ed., *Les Mycotoxines dans l'Alimentation: Evaluation et Gestion du Risque [Mycotoxins in Food: Evaluation and Management of Risk]*, Paris, Technique et Documentation: 371–384.
632. Verma, R.J. and Mehta, D.N. (1998) Occurance of hemolytic anemia during aflatoxicosis, *Indian Journal of Environment. & Toxicology*, 8(1): 5-7.
633. Visconti, A., Pascale, M., Centonze, G. (1999) Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 864: 89–101.
634. **Voyatzidaki Z.**, Georgiadou M. and Yanniotis St. (2008) A study of Aflatoxin. Contamination in greek pistachios” **GREMPA** Proceedings, 31/3 – 4/4 Athens, Greece (2008).
635. Wagacha, J.M., and Muthomi, J.W. (2008) Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 1-12.
636. Waliyar, F., Traore, A., Fatondji, D., Ntare, B.R. (2003) Effect of irrigation interval, planting date, and cultivar on *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination of peanut in a sandy soil of Niger. *Peanut Science*, 30: 79–84.
637. Waltking A.E., Wilson D. (2006) Liquid chromatographic analysis of aflatoxin using post-column photochemical derivatization: collaborative study. *J. AOAC Int.*, 89: 678–692.
638. Wang Y., Dostálek J., Knoll W. (2009) Long range surface plasmon- enhanced fluorescence spectroscopy for the detection of aflatoxin M-1 in milk. *Biosens Bioelectron* 24: 2264–2267.

639. Wang, J., Zhou, Y., Wang, Q. (2008) Analysis of mycotoxin fumonisins in corn products by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *Food Chem.*, 107, 970–976.
640. Wang, J.S., Luo, H., Billam, M., Wang, Z., Guan, H., Tang, L., Goldston, T., Afriyie-Gyawu, E., Lovett, C., Griswold, J., et al. (2005) Short-term safety evaluation of processed calcium montmorillonite clay (NovaSil) in humans. *Food Addit. Contam.* 22: 270–279.
641. Wang, J.S., Shen, X., He, X., Zhu, Y.R., Zhang, B.C., Wang, J.B., Qian, G.S., Kuang, S.Y., Zarba, A., Egner, P.A., Jacobson, L.P., et al. (1999) Protective alterations in phase 1 and 2 metabolism of aflatoxin B1 by oltipraz in residents of Qidong, People's Republic of China. *J. Natl Cancer Inst.* 91, 347–354.
642. Wang, P., Afriyie-Gyawu, E., Tang, Y., Johnson, N.M., Xu, L., Tang, L., Huebner, H.J., Ankrah, N.A., Ofori-Adjei, D., Ellis, W., et al. (2008) NovaSil clay intervention in Ghanaians at high risk for aflatoxicosis: II. Reduction in biomarkers of aflatoxin exposure in blood and urine. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, 25: 622–634.
643. Wei, H., Cheng, B.C., Wan, C.X., Yang, S.L., Xu, H.Y., Liu, J.S., Tian, W.H., and Zeng, M. (2010) Detoxification of Deoxynivalenol by *Bacillus* Strains. *Journal of Food Safety*, 30: 599-614.
644. Wei, J., Okerberg, E., Dunlap, J., Ly, C., and Shear, J.B., (2000) Determination of biological toxins using capillary electrophoretic chromatography with multiphoton-excited fluorescence, *Anal. Chem.*, 72: 1360–1363,
645. Whitaker, T.B., (2006) Sampling foods for mycotoxins, *Food Addit. Contam.*, 23: 50–61
646. WHO (2008). World Health Statistics. WHO Press, Geneva, http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS08_Full.pdf.
647. WHO, World Health Organization (1979) Environmental Health Criteria, Safety evaluation of certain food additives.: 1-127
648. WHO, World Health Organization (1993) Biomarkers and risk assessment: concepts and principles, IPCS, WHO, Geneva.
649. WHO, World Health Organization (1999) Principles for the assessment of risk to human health from exposure to chemicals. Environmental Health Criteria 210, WHO, Geneva.

650. WHO, World Health Organization (2000) Evaluation of certain food additives and contaminants. Technical Report Series no. 896. WHO, Geneva.
651. WHO, World Health Organization (2006) Principles for evaluating health risks in children associated with exposure to chemicals. Environmental Health Criteria 237.
652. WHO. (1998). World Health Organization. Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Aflatoxins. WHO Food Additives Series 40. Geneva: WHO. pp. 359–468.
653. WHO/FAO, (1997) Safety evaluation of certain food additives and contaminants, FAS, 40. Prepared by the forty-ninth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). IPCS, WHO/FAO.
654. Wicklow, D.T. (1987) Survival of *Aspergillus flavus* sclerotia in soil, Trans. Br. Mycol. Soc., 89: 131–134.
655. Wicklow, D.T. and Donahue, J.E. (1984) Sporogenic germination of sclerotia in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, Trans. Br. Mycol. Soc., 82: 621–624.
656. Wicklow, D.T. and Wilson, D.M. (1986) Germination of *Aspergillus flavus* sclerotia in a Georgia maize field, Trans. Br. Mycol. Soc., 87(4): 651–653.
657. Wicklow, D.T., Horn, B.W. and Cole, R.J. (1982) Sclerotium production by *Aspergillus flavus* on corn kernels, Mycologia, 74(3): 398–403.
658. Wicklow, D.T., Horn, B.W., Burg, W.R. and Cole, R.J. (1984) Sclerotium dispersal of *Aspergillus flavus* and *Eupenicillium ochrosalmoneum* from maize during harvest, Trans Br Mycol Soc, 83: 299.
659. Wicklow, D.T., McAlpin, C.E., and Platis, C.E. (1998) Characterization of the *Aspergillus flavus* population within an Illinois corn field, Mycol. Res., 102: 263–268.
660. Wicklow, D.T., Wilson, D.M. and Nelsen, T.C. (1993) Survival of *Aspergillus flavus* sclerotia and conidia buried in soil in Illinois or Georgia, Phytopathology, 83(11): 1141–1147.
661. Widstrom, N.W. (1992) Aflatoxin in developing maize: interactions among involved biota and pertinent econiche factors, in Handbook of Applied Mycology: Mycotoxins in Ecological Systems, Bhatnager, D., Lillehoj, E.B., and Arora, D.K., Eds., Marcel Dekker, New York, 5: 23–58.

662. Widstrom, N.W. (1996) The aflatoxin problem with corn grain, in *Advances in Agronomy*, Sparks, D., Ed., Academic Press, New York: 219-280.
663. Widstrom, N.W., McMillian, W.W., Beaver, R.W., and Wilson, D.M. (1990) Weather-associated changes in aflatoxin contamination of preharvest maize, *J. Prod. Agric.*, 3: 196–199.
664. Widstrom, N.W., Wilson, D.M., and Mc. Millan, W.W. (1984) Ear resistance of Crop maize inbreds to field aflatoxin contamination *Sci.* 24: 1154-1157.
665. Wild C. and Gong Y. (2010) Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, 31: 71-82.
666. Wilkes, J.G., Sutherland, J.B. (1998) Sample preparation and high-resolution separation of mycotoxins possessing carboxyl groups. *J. Chromatogr. B*, 717: 135–156.
667. Williams, J.H.; Phillips, T.D.; Jolly, P.E.; Stiles, J.K.; Jolly, C.M. and Aggarwal, D. (2004) Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(5): 1106-1122.
668. Wilson D.M., Gueldner R.C., McKinney J.K., Lievsay R.H., Evans B.D., Hill, R.A. (1981) Effect of β Ionone on *aspergillus flavus* and *aspergillus parasiticus* growth, sporulation, morphology and aflatoxin production, *J Am Chem Soc*, 58(12): 959-961.
669. Wilson, R.A., Calvo, A.M., Chang, P.K., Keller, N.P. (2004) Characterization of the *Aspergillus parasiticus* delta 12-desaturase gene: a role for lipid metabolism in the *Aspergillus*-seed interaction, *Microbiology*, 150: 2881–2888.
670. Windstrom N.W., Wilson D.M., and Mc. Millan W.W. (1984) Ear resistance of maize inbreds to field aflatoxin contamination. *Crop Sci.*, 24: 1154–1157.
671. Wogan, G.N. (1966) Chemical nature and Biological Effects of the Aflatoxins, *Bacteriological Reviews*, 30(2): 460-470.
672. Wogan, G.N. (2000) Impacts of chemicals on liver cancer risk, *Semin. Cancer Biol.*, 10(3): 201–210.
673. Wogan, G.N. and Newberne, P.M. (1967) Dose-response characteristics of aflatoxin BI carcinogenesis in the rat. *Cancer Res* 27: 2370.
674. Woloshuk C.P., Cavaletto J.R., Cleveland T.E.. (1997) Inducers of aflatoxin biosynthesis from colonized maize kernels are generated by an amylase activity from *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 87: 164–169.

675. Wolzak A, Pearson AM, Coleman TH, Pestka JJ, Gray JI (1985) Aflatoxin deposition and clearance in the eggs of laying hens. *Food Chern Toxicol* 23: 1057-1061.
676. Wolzak, A., Pearson, A.M., Coleman, T.H., Pestka, J.J., Gray, J.L. (1985) Aflatoxin deposition and clearance in the eggs of laying hens. *Food Chern Toxicol* 23: 1057-1061.
677. Wood, E.M. and Larson, C.P. (1961) Hepatic carcinoma in rainbow trout. *Arch. Pathol*, 71: 471-479.
678. Wotton, H.R., Strange, R.N. (1987) Increased susceptibility and reduced phytoalexin accumulation in drought-stressed peanut kernels challenged with *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 270–273.
679. Wright, M.S., Greene-McDowelle, D.M., Zeringue, H.J. Jr., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. (2000) Effects of volatile aldehydes from aflatoxin-resistant varieties of corn on *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin biosynthesis, *Toxicon*, 38: 1215–1223.
680. Wu, F. (2008) A tale of two commodities: how EU mycotoxin regulations have affected food industries. *World Mycotox J.*, 1: 71–78.
681. Wyatt, R.D. (1991): "Poultry." pp. 553-578, In: Smith, J.E. and Henderson, R.S. (1991).
682. Xavier, J.J.M., Scussel, V.M. (2008) Development of an LC-MS/MS method for the determination of aflatoxins B-1, B-2, G(1), and G(2) in Brazil nut. *Intern. J. Envir. Anal. Chem.*, 88: 425–433.
683. Xu, H., Annis, S., Linz, J., and Trail, F. (2000) Infection and colonization of peanut pods by *Aspergillus parasiticus* and the expression of the aflatoxin biosynthetic gene, *nor-1*, in infection hyphae, *Physiol. Molec. Plant Pathol.*, 56: 185–196.
684. Xu, Z.R., Han, X.Y., Huang, Q.C., Li, W.F., and Jiang, J.F. (2008) Changes in growth performance, digestive enzyme activities and nutrient digestibility of cherry valley ducks in response to aflatoxin B(1) levels. *Livestock Science*, 119: 216-220.
685. Yabe, K. and Nakajima, H. (2004) Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64(6): 745–755.
686. Yadgiri, B., Reddy, V., Tulupe, P.G., Srikantia, S.G. and Copalan, C. (1970) Aflatoxin and Indian childhood cirrhosis. *Am. J. Clin. Nutr*, 23: 94-98.

687. Yang, C.S., Lambert, J.D., Hou, Z., Ju, J., Lu, G., and Hao, X. (2006) Molecular targets for the cancer preventive activity of tea polyphenols. *Mol. Carcinog.* 45: 431–435.
688. Yang, M.-H., Chen, J.-M., and Zhang, X.-H. (2005) Immunoaffinity Column Clean-Up and Liquid Chromatography with Post-Column Derivatization for Analysis of Aflatoxins in Traditional Chinese Medicine. *Chromatographia*, 62: 499-504.
689. Yang, W.C. (1983) Effects of aflatoxin B, on the development of porcine cellular and humoral immune responses. *Dissertaion Abs Int* 44/06-B: 1778.
690. Yassin, M.A., El-Samawaty, A.M.A., Moslem, M., Bahkali, A., and Abd-Elsalam, K. (2011) Fungal Biota and Occurrence of Aflatoxigenic *Aspergillus* in Postharvest Corn Grains. *Fresenius Environmental Bulletin*, 20: 903-909.
691. Yazdanpanah, H. (2006) Mycotoxin Contamination of Foodstuffs and Feedstuffs in Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 1: 9-16.
692. Yazdanpanah, H., Mohammadi, T., Abouhossain, G., and Cheraghali, A.M. (2005) Effect of roasting on degradation of Aflatoxins in contaminated pistachio nuts. *Food and Chemical Toxicology*, 43: 1135-1139.
693. Yiannikouris, A. and Jonany J. (2002) Mycotoxins in feeds and their fate in animals: A review. *Anim. Res.*, 51: 81-99.
694. Young J.C., D.E. Games, J. (1994) [Analysis of Fusarium mycotoxins by gas chromatography-Fourier transform infrared spectroscopy](#) *Chromatogr. A*, 663: 211-218
695. Yousef A.E .and Marth E.H.. (1989) Stability and Degradation of Aflatoxin M1. In: *Mycotoxins in Dairy Products*. Hans P.Van Egmond (Ed.) Elsevier Applied Science, London and New York. Chapter 5: 127-161.
696. Yu J. Woloshul C.P., Bhatnagar D., and Cleveland T.E. (2000b) Cloning and characterization of avfA and omtB genes involved in aflatoxin biosynthesis in three *Aspergillus* species. *Gene*, 248: 157–167.
697. Yu J., Chang P.K., Bhatnagar D., Cleveland T.E. (2000a) Cloning of sugar utilization gene cluster in *Aspergillus parasiticus*, *Biochim. et Biophys. Acta*, 1493: 211–214.
698. Yu J., Chu F.S., (1991) Immunochromatography of fusarochromanone mycotoxins *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74(4):655-660

699. Yu, J., Bhatnagar, D. and Ehrlich, K.C. (2002) Aflatoxin biosynthesis. *Rev Iberoam Micol*, 19: 191-200.
700. Yu, J., Chang, P.K., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., Linz, J.E., Woloshuk, C.P. and Bennett, J.W. (2004) Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*, 70(3): 1253–1262.
701. Zaghini, A., Martelli, G., Roncada, P., Simioli, M. and Rizzi, L.(2005): Mannanoligosaccharides and aflatoxin B1 in feed for laying hens: Effects on egg quality, aflatoxins B and M residues in eggs and aflatoxin B1 levels in liver. *Poult. Sci.* 84, 6: 825-832.
702. Zain, M.E. (2011) Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15: 129-144.
703. Zeringue H.J. Jr. and McCormick S.R. (1990) Aflatoxin production in cultures of *Aspergillus flavus* incubated in atmospheres containing cotton leaf-derived volatiles, *Toxicon*, 28: 445–448.
704. Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C.G., and Posner, G.H. (1992) A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 89: 2399–2403.
705. Zhao, J., Shirley, R.B., Dibner, J.D., Uraizee, F., Officer, M., Kitchell, M., Vazquez-Anon, M., and Knight, C.D. (2010) Comparison of hydrated sodium calcium aluminosilicate and yeast cell wall on counteracting aflatoxicosis in broiler chicks. *Poultry Science*, 89: 2147-2156.
706. Zheng M.Z., Richard J.L., Binder J. (2006) A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* 161: 261–273
707. Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnach, F., Angelini, S., De Santis, B., Faid, M., Benlemlih, M., Minardi, V., and Miraglia, M. (2006) Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control*, 17: 868-874.
708. Zöllner, P., Mayer-Helm, B. (2006) Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1136: 123–169.
709. Zorlugenc, B., Kiroglu Zorlugenc, F., Oztekin, S., and Evliya, I. B. (2008) The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of aflatoxin B(1) in dried figs. *Food Chem Toxicol*, 46: 3593-3597.

710. Zougagh, M., Ríos, A. (2008) Supercritical fluid extraction of macrocyclic lactone mycotoxins in maize flour samples for rapid amperometric screening and alternative liquid chromatographic method for confirmation. *J. Chromatogr. A*, 1177: 50–57.
711. Zuber, M.S. and Lillehoj, E.B. (1987) Aflatoxin contamination in maize and its biocontrol, in *Biocontrol of Plant Diseases*, Murkerji, K.G. and Garg, K.L., Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 2: 85–102.
712. Zuber, M.S., Darrah, L.L., Lillehoj, E.B., Josephson, L.M., Manwiller, A., Scott, G.E., Gudauskas, R.T., Horner, E.S., Widstrom, N.W., Thompson, D.L., Bockholt, A.J., and Brewbaker, J.L. (1983) Comparison of open-pollinated maize varieties and hybrids for preharvest aflatoxin contamination in the southern United States, *Plant Dis.*, 67: 185–187.
713. Zummo, N. and Scott, G.E. (1990) Relative aggressiveness of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on maize in Mississippi, *Plant Dis.*, 74: 978–981.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ΕΛ.ΙΝ.Υ.Α.Ε. (Ελληνικό Ινστιτούτο Υγιεινής και Ασφάλειας της Εργασίας): (2007) Μελέτη πρόληψης επαγγελματικών καρκίνων.
2. Κανονισμός (ΕΕ) 165/2010 της Επιτροπής, της 26^{ης} Φεβρουαρίου 2010, για την τροποποίηση του Καν. 1881/2006, αναφορικά με τις αφλατοξίνες.
3. Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 της Επιτροπής, της 19^{ης} Δεκεμβρίου 2006, για τον καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα.
4. Μαλισσιόβα, Ε., Αρβανιτογιάννης Ι., Τσακάλωφ Α., Παππάς Φ., Μιχαλοπούλου Π., Μπούτσικα Β., Βρυώνης Ε., Χατζηχριστοδούλου Χ. (2011) “Παρουσία αφλατοξίνης M1 σε αίγαιο και πρόβειο γάλα, βιολογικής και συμβατικής προέλευσης, στην περιοχή της Θεσσαλίας”, 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο του Φόρουμ Δημόσιας Υγείας and Κοινωνικής Ιατρικής, 25-27 Νοεμβρίου 2011, Λάρισα.
5. Μαρκάκη, Π., Βαλαβανίδης, Θ., Ευσταθίου, Κ. (2007) "Η χημική ένωση του μήνα-Αφλατοξίνες", http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_aflatoxins.htm

