

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ  
ΠΟΙΟΤΗΤΑ – ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Μ1 ΣΕ  
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΒΕΙΟΥ ΚΑΙ ΛΙΓΕΙΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΗΝ  
ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ»**

**ΒΟΥΖΑΡΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ Α.Π.Θ.

ΛΑΡΙΣΑ 2013

## ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Μ1 ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΒΕΙΟΥ ΚΑΙ ΑΙΓΕΙΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αφλατοξίνη Μ1 (AFM1) μπορεί να βρεθεί στο γάλα και τα προϊόντα γάλακτος που λαμβάνονται από ζώα που έχουν καταναλώσει ζωοτροφές μολυσμένες με αφλατοξίνη Β1. Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη Δημόσια Υγεία αφού έχει ισχυρά τοξική και καρκινογόνο δράση. Η μέγιστη τιμή ανοχής για την AFM1 στο γάλα, ορίζεται από την Ευρωπαϊκή Ένωση στα 50 ng/kg [Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 165/2010].

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτελούσε η μελέτη της παρουσία της AFM1 σε νωπό πρόβειο και αίγιο γάλα από εκτροφές μικρής και μεσαίας δυναμικότητας στην περιοχή της Θεσσαλίας. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν 50 δείγματα νωπού γάλακτος (35 δείγματα πρόβειου και 15 αίγειου) και στη συνέχεια αναλύθηκαν με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA). Η ανάλυση των δειγμάτων έδειξε παρουσία της AFM1 στο 77,1% και 66,7% για το πρόβειο και αίγιο γάλα, αντίστοιχα. Ωστόσο σε όλα τα δείγματα αίγειου γάλακτος που διαπιστώθηκε η παρουσία της AFM1 η συγκέντρωση ήταν μικρότερη από το όριο των 50 ng/kg που ορίζεται στην Ε.Ε. Αντίθετα σε 5 δείγματα πρόβειου γάλακτος (ποσοστό 14,3%) βρέθηκε η συγκέντρωση της AFM1 να υπερβαίνει το παραπάνω όριο.

Η παρουσία της AFM1 με τις σημαντικές επιπτώσεις που αυτή μπορεί να επιφέρει στην υγεία των καταναλωτών δείχνει την ανάγκη για διαρκή επιτήρηση και έλεγχο τόσο στην πρωτογενή παραγωγή, τη βιομηχανία γάλακτος όσο και στο επίπεδο των τελικών προϊόντων. Η σημασία των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας ενισχύεται από το γεγονός ότι η μεγαλύτερη ποσότητα πρόβειου και αίγειου γάλακτος που παράγεται στην Ελλάδα χρησιμοποιείται τελικά για την παραγωγή τυριών.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 <sup>ο</sup> : ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 <sup>ο</sup> : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	6
2.1. Παραγωγή πρόβειου και αίγειου γάλακτος	6
2.1.1. Υφιστάμενη κατάσταση κοινοτικής αιγοπροβατοτροφίας	6
2.1.2. Ελληνική αιγοπροβατοτροφία	7
2.1.3. Αριθμός εκμεταλλεύσεων και οικονομική σημασία της Ελληνικής αιγοπροβατοτροφίας	8
2.1.4. Παραγωγή και χρήση αίγειου και πρόβειου γάλακτος	9
2.1.5. Αξιοποίηση του αίγειου και πρόβειου γάλακτος	10
2.1.6. Χαρακτηριστικά του πρόβειου γάλακτος	10
2.1.7. Χαρακτηριστικά του αίγειου γάλακτος	11
2.2. Μυκοτοξίνες	12
2.2.1. Γενικά	12
2.2.2. Οι κυριότερες μυκοτοξίνες	13
2.2.3. Χαρακτηριστικά των μυκοτοξινών	14
2.2.4. Παραγωγή μυκοτοξινών	16
2.2.4.1. Παραγωγή μυκοτοξινών στα φυτά	16
2.2.4.2. Παραγωγή μυκοτοξινών στις ζωοτροφές	18
2.2.5. Επίπτώσεις των μυκοτοξινών στην υγεία των ζώων	21
2.2.6. Ωχρατοξίνη Α	24
2.2.7. Τριχοθεσίνες	25
2.2.8. Ζεαραλενόνη	26
2.2.9. Φουμονισίνες	27
2.2.10. Άλλες μυκοτοξίνες	28
2.3. Αφλατοξίνες	28
2.3.1. Ιδιότητες των αφλατοξινών	33
2.3.2. Αφλατοξίνη Μ1	34
2.3.3. Παρουσία αφλατοξίνης Μ1 στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα	36
2.4. Τοξικότητα των αφλατοξινών	41
2.5. Επίπτωση στην υγεία του ανθρώπου	43
2.6. Μέθοδοι πρόληψης και αντιμετώπισης της παρουσίας αφλατοξινών	46

2.6.1.	Πρόληψη της ανάπτυξης μυκήτων και της παραγωγής αφλατοξινών στις πρώτες ύλες ζωοτροφών	46
2.6.2.	Μέθοδοι αδρανοποίησης αφλατοξινών	48
2.6.3.	Εντοπισμός και απομάκρυνση των προσβεβλημένων με αφλατοξίνες ζωοτροφών	51
2.6.4.	Μέθοδοι μείωσης της συγκέντρωσης της AFM1 στα γαλακτοκομικά προϊόντα	52
2.7.	Στοιχεία νομοθεσίας	53
2.8.	Μέθοδοι ανίχνευσης και προσδιορισμού της συγκέντρωσης των Αφλατοξινών	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 <sup>ο</sup> : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ		60
3.1.	Συλλογή Δειγμάτων	60
3.2.	Προσδιορισμός της Αφλατοξίνης M1 στο γάλα	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 <sup>ο</sup> : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ		62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 <sup>ο</sup> : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ		66
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		67

# ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα προβλήματα αλλοίωσης των τροφίμων από τους μικροοργανισμούς και παράλληλα των τροφικών δηλητηριάσεων, εμφανίστηκαν σχεδόν ταυτόχρονα με τις πρώτες προσπάθειες παραγωγής τροφίμων (πριν από 8.000-10.000 χρόνια). Τα προβλήματα συνδέονταν με την ταχεία αλλοίωση των τροφίμων, λόγω ακατάλληλης αποθήκευσης ή ασθενειών που μεταδίδονται στον άνθρωπο, μέσω των τροφίμων.

Είναι γνωστό ότι τα τρόφιμα αποτελούν άριστο υπόστρωμα ανάπτυξης πολλών μικροοργανισμών, είτε παθογόνων, είτε αλλοιογόνων. Ανάμεσα σε αυτούς, περιλαμβάνονται και οι μύκητες, οι οποίοι κάτω από κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν, όχι μόνον να αλλοιώσουν ένα τρόφιμο, αλλά κάποιιο από αυτούς να παράγουν και μυκοτοξίνες, τοξίνες που προκαλούν σοβαρά προβλήματα στην υγεία ανθρώπων και ζώων. Οι μύκητες είναι μικροοργανισμοί που είναι είτε σαπροφυτικοί, καθώς αναπτύσσονται σε νεκρή οργανική ύλη, ή πιο συνηθέστερα παρασιτικοί, καθώς επιβιώνουν σε άλλους ζωντανούς οργανισμούς.

Διάφοροι τύποι μυκοτοξινών παράγονται στη φύση, αλλά δεν απαντώνται όλοι το ίδιο συχνά, ούτε είναι το ίδιο τοξικοί. Τα τελευταία χρόνια οι μυκοτοξίνες ανιχνεύονται ολοένα και συχνότερα στις ζωοτροφές, γεγονός που αποδίδεται εν μέρει και στην παγκόσμια κλιματική αλλαγή που βρίσκεται σε εξέλιξη. Η πρόσληψή τους από τα ζώα έχει ιδιαίτερες και σημαντικές επιπτώσεις, τόσο στην υγεία τους, όσο και στην βιωσιμότητα και οικονομικότητα των εκτροφών, ενώ οι επιπτώσεις επεκτείνονται, μέσω της τροφικής αλυσίδας, και στον άνθρωπο. Μας απασχολεί ιδιαίτερα η ύπαρξη των αφλατοξινών στο γάλα, καθώς το γάλα είναι βασικό συστατικό της ανθρώπινης διατροφής και καταναλώνεται κυρίως από βρέφη και παιδιά που είναι δυνητικά πιο ευαίσθητα στις τοξίνες και των οποίων η διαίτα παρουσιάζει μικρότερη ποικιλία από αυτή των ενηλίκων. Από τις αφλατοξίνες, η Αφλατοξίνη Μ<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) ονομάζεται και «τοξίνη του γάλακτος», καθώς οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της παρατηρούνται στο γάλα (Κουρουσέκος, 2008).

Σε έρευνα της Roussi και των συν. (2001), στο 73,3 και 66,7% των δειγμάτων πρόβειου και γίδινου γάλακτος, από παγολεκάνες σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας, που εξετάστηκαν, διαπιστώθηκε η παρουσία της τοξίνης AFM<sub>1</sub>.

Καθώς η AFM<sub>1</sub> συνδέεται με την πρωτεΐνη του γάλακτος, η συγκέντρωσή της στο τυρί, είναι 3-4 φορές υψηλότερη από εκείνη του γάλακτος (Kriermeier and Buchner, 1977). Έτσι η μελέτη της μόλυνσης του πρόβειου γάλακτος από αφλατοξίνη, είναι πραγματικά σημαντική, λόγω του γεγονότος ότι η πλειοψηφία του πρόβειου γάλακτος που παράγεται, μετατρέπεται σε τυρί (Pulina and Furesi, 2001), καθώς επίσης και επειδή το πρόβειο γάλα έχει μία υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, σε σχέση με το αγελαδινό.

Η Kaniou-Grigoriadou (2005) κατά τη διάρκεια ελέγχου για την παρουσία AFM<sub>1</sub> σε 54 δείγματα τυριού Φέτας, δεν ανίχνευσε αφλατοξίνη σε κανένα από τα δείγματα που εξετάστηκαν. Οι Virdis και συν. (2008) μελετώντας τη συγκέντρωση της AFM<sub>1</sub> σε 41 δείγματα τυριού από αίγαιο γάλα στη Σαρδηνία της Ιταλίας, εντόπισαν αφλατοξίνη σε 4 δείγματα ή σε ποσοστό 9,8%, και μάλιστα σε αυτά που παρασκευάστηκαν από γάλα ζώων εντατικής εκτροφής.

Γενικά τα ερευνητικά δεδομένα από τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (E.E.), δεν αναφέρουν προβλήματα υπέρβασης των τιμών της συγκεκριμένης τοξίνης, γεγονός που πρέπει να αποδοθεί στην αυστηρή ισχύουσα Νομοθεσία και στους εντατικούς ελέγχους που πραγματοποιούνται για την εφαρμογή της.

Η παρούσα διατριβή επικεντρώνεται στη διερεύνηση της παρουσίας, της AFM<sub>1</sub> στο γάλα προβάτων και αιγών που εκτρέφονται στην ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας.

Για την διεξαγωγή του πειραματικού μέρους χρησιμοποιήθηκαν οι εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων, της Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της AFM<sub>1</sub> πραγματοποιήθηκε με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup> : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ**

### **2.1. Παραγωγή πρόβειου και αίγειου γάλακτος**

Η αιγοπροβατοτροφία αποτελεί το σημαντικότερο και περισσότερο διαδεδομένο και ανεπτυγμένο κλάδο της ελληνικής κτηνοτροφίας, που δραστηριοποιείται κυρίως στον ορεινό και ημιορεινό αγροτικό χώρο. Ουσιαστικά πρόκειται για ένα εκτεταμένο βιολογικό μέσο μετατροπής αγροτικών προϊόντων και βοσκήσιμης ύλης σε ζωοκομικά προϊόντα. Με συνολικό πληθυσμό 14.000.000 κεφαλών, παράγει το 60% και το 24% της εγχώριας παραγωγής γάλακτος και κρέατος, αντίστοιχα (στοιχεία 2005), παρότι ο προαναφερόμενος ζωικός πληθυσμός κατά την περίοδο 1995-2005, μειώθηκε κατά 3,7% (Eurostat, 2005). Η μείωση αυτή προσδιορίζεται κυρίως από τη μείωση των αιγών κατά 12,7%. Ο αριθμός των προβατοτροφικών εκμεταλλεύσεων μειώθηκε, κατά την ίδια περίοδο, κατά 15,2% και από 315.050 το 1995, έφθασε στις 267.050 το 2005. Αντίθετα, το μέγεθος των αιγοπροβατοτροφικών εκμεταλλεύσεων παρουσιάζει σαφή αυξητική τάση (Βακάκης, 2007).

#### **2.1.1. Υφιστάμενη κατάσταση κοινοτικής αιγοπροβατοτροφίας**

Σε αντίθεση με την Ελλάδα, ο κλάδος αυτός δεν έχει την ίδια σημασία για τις περισσότερες χώρες μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ). Η εκτροφή προβάτων για παραγωγή γάλακτος αλλά και κρέατος, αποτελεί δραστηριότητα που ασκείται κυρίως στις νότιες χώρες, όπου αρμέγεται μεγάλος αριθμός ζώων, πχ. Ελλάδα 95%, Ιταλία 70% κ.τ.λ. ενώ στην ΕΕ αρμέγεται περίπου το 30% των προβατίνων κατά μέσο όρο. Στην ΕΕ εκτρέφονται περίπου 100,5 εκ. πρόβατα και αίγες, με τους μεγαλύτερους αριθμούς από πλευράς προβάτων να εντοπίζονται στη Ηνωμένο Βασίλειο με 24,4 εκ., στην Ισπανία με 22,5 εκ., στην Ιταλία με 8 εκ., στην Γαλλία με 8,8 εκ. και στην Ελλάδα με 8,5 εκ. με βάση στοιχεία του 2005. Σε ότι αφορά τις αίγες, και για το ίδιο έτος, η Ελλάδα φαινόταν να εκτρέφει 5,1 εκ. ζώα περίπου και ακολουθούσε η Ισπανία με 2,9 εκ. η Γαλλία με 1,2 εκ. και η Ιταλία με 960.000 ζώα, περίπου (Eurostat, 2005). Είναι προφανές ότι στη χώρα μας εκτρέφεται περίπου το 45% του συνολικού αριθμού των αιγών της ΕΕ. Παρόλα αυτά, ενώ στην ΕΕ η εκτροφή προβάτων και αιγών γίνεται με κύρια παραγωγική κατεύθυνση το κρέας, στην Ελλάδα, η κύρια κατεύθυνση παραμένει το γάλα, καθώς το 95% των ζώων αρμέγεται,

δραστηριότητα που συναντάται και στις υπόλοιπες γειτονικές χώρες της Βαλκανικής χερσονήσου. Σε ότι αφορά το αίγιο γάλα, αξιοποιείται κατά βάση στην παραγωγή ορισμένων τυριών, κυρίως στη Γαλλία, Ιταλία και Ελλάδα. Συμπερασματικά, η αιγοπροβατοτροφία προσφέρεται σαν μία πολύ σημαντική διέξοδος της σύγχρονης αγροτικής οικονομίας.

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 5 ετών, η παραγωγή του πρόβειου γάλακτος παγκοσμίως παρέμεινε σταθερή, περίπου στους 9.000.000 τόνους, με ένα ποσοστό κοντά στο 30% να παράγεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση (FAO, 2008), όπου και χρησιμοποιείται αποκλειστικά σχεδόν για τυροκόμηση.

### **2.1.2.Ελληνική αιγοπροβατοτροφία**

Για τη χώρα μας η αιγοπροβατοτροφία αποτελεί τον πλέον παραδοσιακό κλάδο της κτηνοτροφίας και είναι συνδεδεμένη με μυθολογικά, ηθολογικά και παραδοσιακά στοιχεία. Ο κλάδος αυτός συνέβαλε ουσιαστικά στην επιβίωση του λαού μας σε δύσκολες περιόδους, ενώ ακόμα και σήμερα αποτελεί σημαντική οικονομική δραστηριότητα (κύρια και συμπληρωματική) σε πολλές περιοχές, ιδιαίτερα στις ορεινές και τις νησιωτικές. Στηρίχθηκε στους άφθονους φυσικούς πόρους και προσαρμόστηκε στις ιδιαίτερες κλιματολογικές και εδαφολογικές συνθήκες της πατρίδας μας. Το δυνατότερο ίσως σημείο του τομέα αυτού, είναι η υψηλή ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων, ως αποτέλεσμα μιας σειράς παραμέτρων που χαρακτηρίζουν την ελληνική πραγματικότητα και έχουν να κάνουν με το εκτατικό σύστημα εκτροφής, τις εγχώριες φυλές και τις χορηγούμενες ζωοτροφές. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μία σημαντική μείωση των παραγωγικών ζώων που εκτρέφονται νομαδικά ή οικόσιτα και μία αντίστοιχη τάση συγκέντρωσής τους σε μεγάλες και οργανωμένες μονάδες. Η διατροφή τους όμως συνεχίζει να στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στους φυσικούς βοσκότοπους (λιβάδια), οι οποίοι αποτελούν περίπου το 40% της συνολικής έκτασης της χώρας, ενώ τα περισσότερα από αυτά τα λιβάδια (περίπου το 85%) βρίσκονται σε ορεινές και ημιορεινές περιοχές. Υπολογίζεται ότι τα πρόβατα και οι αίγες αξιοποιούν περίπου 10,5 εκ. τόνους ξηρής βοσκήσιμης ύλης, που παράγεται ετησίως στους φυσικούς βοσκότοπους της χώρας, παρέχοντας εισόδημα και πολύτιμες θέσεις εργασίας σε χιλιάδες οικογένειες.



Η κυρίαρχη μορφή των εκμεταλλεύσεων στη χώρα μας συνίσταται σε μικρές οικογενειακές μονάδες, εκτατικής μορφής, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεγάλο βαθμό διαφοροποίησης ως προς το μέγεθος, τις σταβλικές εγκαταστάσεις, την παραγωγή κ.τ.λ. Το «εκτατικό σύστημα», με βάση το οποίο εκτρέφονται τα περισσότερα αιγοπρόβατα (περίπου το 85%) χαρακτηρίζεται από ετήσιες μετακινήσεις (προς και από τους θερινούς-ορεινούς βοσκοτόπους) και από μεγάλες διαδρομές των κοπαδιών, κατά τη διάρκεια της ημέρας, μέσα στους βοσκοτόπους, για εξεύρεση βοσκής. Η χωροταξική κατανομή των προβάτων και των αιγών είναι περίπου η ίδια σε όλες τις περιφέρειες της χώρας. Τα τελευταία χρόνια η συμμετοχή των συγκομιζόμενων ζωοτροφών βαίνει αυξανόμενη και διαγράφεται μία τάση δημιουργίας αιγοπροβατοτροφικών μονάδων στις πεδινές περιοχές, με εκμεταλλεύσεις «εντατικού τύπου», που εμφανίζουν μεγαλύτερο βαθμό εκμηχάνισης και φυσικά απαιτούν περισσότερα επενδυμένα κεφάλαια. Οι υπόλοιπες υπάρχουσες μονάδες χαρακτηρίζονται από αρκετά διαρθρωτικά προβλήματα και χρήζουν εκσυγχρονισμού (Υπ.Α.Α.Τ., 2006).

### **2.1.3. Αριθμός εκμεταλλεύσεων και οικονομική σημασία της Ελληνικής αιγοπροβατοτροφίας**

Με τον κλάδο αυτό ασχολούνται περίπου 110.000 εκμεταλλεύσεις με πάνω από 10 ενήλικα ζώα, σύμφωνα με στοιχεία του Ολοκληρωμένου Συστήματος Διαχείρισης και Ελέγχου (Ο.Σ.Δ.Ε.), με τον συνολικό αριθμό προβάτων να ανέρχεται στις 9.000.000 κεφαλές, από τις οποίες το 90% περίπου είναι κυρίως διασταυρώσεις μεταξύ των διαφόρων Ελληνικών φυλών. Η αξία των προϊόντων αντιπροσωπεύει το 7,5% της συνολικής Ακαθάριστης Αξίας της Γεωργικής Παραγωγής της χώρας μας και το 31,85% της Συνολικής Ακαθάριστης Αξίας της Ζωικής Παραγωγής, σύμφωνα με στοιχεία της Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας της Ελλάδος (ΕΣΥΕ), το έτος 2005. Σε ότι αφορά τις αίγες, για το ίδιο έτος, η Ελλάδα εκτρέφει 5,1 εκ. ζώα περίπου, ενώ αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στη χώρα μας εκτρέφεται περίπου το 45% του συνολικού αριθμού αιγών της ΕΕ. Συνολικά, 250.000 οικογένειες απασχολούνται στον τομέα ως κτηνοτρόφοι ή/και μεταποιητές, μέγεθος που αναδεικνύει την αιγοπροβατοτροφία σαν την ραχοκοκαλιά της ελληνικής κτηνοτροφίας. Η προβατοτροφία και αιγοτροφία στην Ελλάδα είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με τις ορεινές και μειονεκτικές περιοχές και πρέπει να διατηρηθεί στις περιοχές αυτές,

επειδή αποτελεί μία από τις σημαντικότερες οικονομικές δραστηριότητες, παρέχοντας εισόδημα και πολύτιμες θέσεις εργασίας σε χιλιάδες οικογένειες.

#### **2.1.4. Παραγωγή και χρήση αίγιου και πρόβειου γάλακτος**

Στη χώρα μας παράγονται περίπου 496.581 τόνοι πρόβειου και 114.614 τόνοι αίγιου γάλακτος, από τους οποίους το 90% του πρόβειου και το 80% του αίγιου, τυροκομείται. Το υπόλοιπο είτε εμφιαλώνεται, είτε αξιοποιείται σε διάφορα άλλα παραδοσιακά προϊόντα (π.χ. γιαούρτη), ή/και ιδιοκαταναλώνεται από τους παραγωγούς (ΕΛΟΓΑΚ, 2012). Την τελευταία δεκαετία η παραγωγή πρόβειου γάλακτος έχει αυξηθεί σημαντικά, παρά το γεγονός ότι ο αριθμός των παραγωγών μειώθηκε, εξαιτίας κυρίως της αύξησης της αποδοτικότητας των ζώων, με τη χρήση σύγχρονων μεθόδων.

Ο κλάδος παρουσιάζει τάσεις εκσυγχρονισμού, στα πλαίσια των προσπαθειών προσαρμογής του στα νέα δεδομένα και απαιτήσεις, για ανταγωνιστικότητα, πιστοποιημένη ποιότητα προϊόντων, περιβαλλοντική προσαρμογή και γενικότερα για προσαρμογή στις απαιτήσεις της πολλαπλής συμμόρφωσης και την εφαρμογή της νέας Κοινής Αγροτικής Πολιτικής (Κ.Α.Π.).

Το γάλα και το κρέας είναι τρόφιμα ζωτικής σημασίας, αναπτυξιακοί μοχλοί και διατροφικά όπλα στρατηγικής σημασίας για τις χώρες που τα παράγουν και τα εμπορεύονται. Σύμφωνα με τα υπάρχοντα στοιχεία, μέχρι και το 2005, η ΕΕ ήταν αυτάρκης στην πλειοψηφία των κτηνοτροφικών προϊόντων, εκτός του πρόβειου και αίγιου κρέατος. Στην Ελλάδα το ποσοστό αυτάρκειας σε πρόβειο κρέας, αγγίζει το 86%. Σε ότι αφορά το αιγοπρόβειο γάλα η χώρα μας είναι γενικά αυτάρκης. Για να έχει όμως προοπτική ο τομέας, πρέπει: α) να υπάρξει στροφή στην ποιότητα και την ασφάλεια των παραγόμενων τελικών προϊόντων (γάλα, τυροκομικά, κρέας κ.τ.λ.), γεγονός που θα ανοίξει ή θα διευρύνει δρόμους σε ανταγωνιστικές αγορές και β) να αυξηθεί η παραγωγή χονδροειδών ζωοτροφών (Υπ.Α.Α.Τ., 2006).

Η εκτροφή ντόπιων φυλών αιγοπροβάτων παραμένει ένα πολύ σημαντικό μέρος της Ελληνικής οικονομίας και καθώς οι Ελληνικές κλιματολογικές συνθήκες μπορούν να προδιαθέσουν την παραγωγή της AFB<sub>1</sub> στις ζωοτροφές, θεωρήθηκε πιθανή η παρουσία της AFM<sub>1</sub> στο γάλα, όπως έχει ήδη παρατηρηθεί στο παρελθόν στην Ελλάδα (Roussi et al, 2002).

### **2.1.5. Αξιοποίηση του αίγειου και πρόβειου γάλακτος**

Η φέτα είναι κατ' εξοχήν Ελληνικό τυρί, γιατί παρασκευάζεται στη χώρα μας από αρχαιοτάτων χρόνων. Η παραγωγή φέτας, η οποία είναι προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ), και πρέπει να παράγεται από γάλα αιγοπροβάτων, εκτιμάται σε 120.000-150.000 τόνους, από την οποία εξάγονται οι 25.000-30.000 τόνοι, όταν η παγκόσμια κατανάλωση εκτιμάται σε 500.000 τόνους. Υπάρχει μία εκτίμηση ότι στην αγορά της Ε.Ε. ο συνολικό τζίρος κατανάλωσης τυριού με το όνομα «ΦΕΤΑ» ανέρχεται στο ποσό του 1δισ € τον χρόνο, ενώ οι εξαγωγές από την Ελλάδα ανέρχονται στα 130 εκ. ευρώ. Στην Ελλάδα έχουν κατοχυρωθεί ως ΠΟΠ 20 ακόμη είδη τυριών που έχουν ως πρώτη ύλη το αιγοπρόβειο γάλα (κασέρι, γραβιέρα, ανθότυρος κ.ά.). Η διαθεσιμότητα του πρόβειου γάλακτος είναι πολύ εποχιακή, καθώς η γαλακτική περίοδος του προβάτου διαρκεί μόνον 5-6 μήνες. Η πλειοψηφία του πρόβειου γάλακτος παράγεται κατά τη διάρκεια των ανοιξιάτικων μηνών.

Η Νέα Κ.Α.Π. της Ε.Ε. έχει σαν στόχο της την αειφόρο αγροτική ανάπτυξη και την παραγωγή ασφαλών προϊόντων, παράλληλα με την διασφάλιση της ευζωίας των ζώων και την προστασία του περιβάλλοντος. Μέσα σε αυτά τα πλαίσια, και με δεδομένες τις σημερινές συνθήκες της διεθνούς οικονομικής κρίσης και της παγκοσμιοποίησης της αγοράς, γίνεται εμφανής η ανάγκη παραγωγής ασφαλών παραδοσιακών προϊόντων τοπικού χαρακτήρα, με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και υψηλή ποιότητα, όπως τα Π.Ο.Π. προϊόντα της Ελληνικής αιγοπροβατοτροφίας. Πέρα όμως από την παραγωγή προϊόντων, η ελεγχόμενη βόσκηση από τις αίγες, συμβάλλει στη διατήρηση της βιοποικιλότητας των οικοσυστημάτων, ενώ αποτελεί ισχυρό μέσο προστασίας από τις πυρκαγιές.

### **2.1.6. Χαρακτηριστικά του πρόβειου γάλακτος**

Γενικά, κοινό χαρακτηριστικό όλων των ειδών γάλακτος που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, είναι ότι περιέχουν τα ίδια συστατικά, σε διαφορετικές όμως αναλογίες. Σε ότι αφορά το πρόβειο γάλα, σε σύγκριση τόσο με το αγελαδινό, όσο και με αυτό της αίγας, είναι σημαντικά πλουσιότερο, τόσο σε λίπος, όσο και σε πρωτεΐνες. Το πρόβειο γάλα περιέχει δύο φορές περισσότερα στερεά και σχεδόν διπλάσια λιπαρά σε σχέση με το αγελαδινό (Anifantakis 1986). Η υψηλή περιεκτικότητά του σε λιπαρά είναι υπεύθυνη για τη μοναδική του γεύση και το

άρωμα των τυριών από πρόβειο γάλα (Anifantakis 1986, Kalantzopoulos 1993). Επίσης η γιαούρτη από γάλα προβάτου διαθέτει μοναδικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (ευχάριστο άρωμα και γεύση και στερεή, κρεμμώδη υφή). Υπερτερεί επίσης και σε άλατα, ενώ η περιεκτικότητά του σε λακτόζη βρίσκεται στα ίδια επίπεδα.

Το χρώμα του πρόβειου γάλακτος είναι λευκό, ανεξάρτητα αν τα ζώα λαμβάνουν χλωρή βοσκή ή όχι, γιατί δεν περιέχει καροτινοειδή, σε αντίθεση με το αγελαδινό γάλα, το οποίο είναι κιτρινωπό λόγω της παρουσίας καροτίνης (Saini and Gill, 1991).

### **2.1.7. Χαρακτηριστικά του αίγειου γάλακτος**

Αναφορικά με τη χημική σύνθεση του αίγειου γάλακτος, θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι, η σύσταση του λίπους του είναι η τυπική του λίπους του γάλακτος των μηρυκαστικών, που χαρακτηρίζονται από την υψηλή περιεκτικότητά τους σε κορεσμένα λιπαρά οξέα μικρού μοριακού βάρους, με την διαφοροποίηση ότι είναι πλουσιότερο σε σχέση με το αγελαδινό, αλλά φτωχότερο σε σύγκριση με το πρόβειο. Η ίδια παραδοχή ισχύει και για τα υπόλοιπα στερεά συστατικά του. Επίσης σε σχέση με το αγελαδινό, περιέχει σε μεγαλύτερη αναλογία λιπαρά οξέα με 6-12 άτομα άνθρακα (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>), με τη σύνθεση των λιπαρών οξέων του να εμφανίζει μία ευρεία διακύμανση, η οποία αποδίδεται στη σύνθεση του σιτηρεσίου που καταναλώνουν. Τέλος, οι πρωτεΐνες του ορού του είναι πιο ευαίσθητες σε σχέση με τις αντίστοιχες του αγελαδινού, σε υψηλές θερμοκρασίες (Agnihotri, 1999).

Δύο όμως χαρακτηριστικά του λίπους του αίγειου γάλακτος έχουν ιδιαίτερη σημασία για την βιομηχανία. Το ένα είναι το μικρότερο μέγεθος των λιποσφαιρίων, σε σύγκριση με το αγελαδινό. Και στα δύο είδη, το μέγεθος των λιποσφαιρίων κυμαίνεται από 1-10 μm, αλλά η αναλογία των λιποσφαιρίων που έχουν μέγεθος μικρότερο από 5 μm είναι 60% στο αγελαδινό γάλα, σε αντίθεση με το αίγιο, που φθάνει στο 80%. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την δυσκολότερη βιομηχανική αφαίρεση της κρέμας από το αίγιο γάλα. Το δεύτερο χαρακτηριστικό έχει σχέση με τη σύσταση των λιπαρών οξέων στο αίγιο γάλα, αφού περιέχει μεγαλύτερη αναλογία λιπαρών οξέων μεσαίας αλύσου, όπως το καπροϊκό, το καπρυλικό και το καπρικό, τα οποία άλλωστε είναι υπεύθυνα και για την χαρακτηριστική οσμή του αίγειου γάλακτος.

Έχει υπολογιστεί ότι περισσότερο από το 80% του παγκόσμιου πληθυσμού αιγών εντοπίζεται στην Ασία και την Αφρική (Morant-Fehr et al., 2004). Άρα, είναι πιθανόν οι περισσότεροι άνθρωποι στον πλανήτη να πίνουν αίγιο γάλα, περισσότερο από κάθε άλλο είδος ζώου. Αυτό που κάνει τις γίδες τόσο δημοφιλείς, είναι η ικανότητά τους να εφοδιάζουν με υψηλής ποιότητας τροφή, κάτω από αντίξοες κλιματικές συνθήκες και η ανθεκτικότητά τους σε ακραία περιβάλλοντα (Silinikore, 1994, 2000). Η έρευνα κατά τη διάρκεια του 20<sup>ου</sup> αιώνα, ανέδειξε τη γνώση των μοναδικών χαρακτηριστικών της σύνθεσης του αίγιου γάλακτος. Το αντικείμενο αυτό καλύφθηκε διεξοδικά από τον Park et al., (2007) και τον Haenlein (2004, 2007).

Η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων από αίγιο γάλα, έχει συνδεθεί με ειδικά πλεονεκτήματα, πέρα από την όποια φτωχή ή όχι διατροφική αξία. Το αίγιο γάλα λόγω της ειδικής του σύνθεσης (λιγότερη λακτόζη, περισσότερη ινοσιτόλη, διαφορετική δομή γαλακτοαλβουμίνης), είναι εύπεπτο, αποτελεί άριστη εναλλακτική λύση για όσους έχουν δυσανεξία στο αγελαδινό γάλα ή στο γάλα σόγιας, είναι ιδανικό για διάφορες μορφές αλλεργίας καθώς περιέχει μικρότερο αριθμό αλλεργιογόνων και ιδιαίτερα ευεργετικό σε περιπτώσεις σιδηροπενίας (Bellioni-Businco et al., 1999).

Επίσης, το αίγιο γάλα περιέχει υψηλότερες συγκεντρώσεις βιταμινών A, D, B1, B2, C και νικοτινικού οξέος, σε σύγκριση με το αγελαδινό, γεγονός που το καθιστά ως ένα τρόφιμο υψηλής βιολογικής αξίας (Pandya and Ghodke, 2007).

## **2.2. Μυκοτοξίνες**

### **2.2.1. Γενικά**

Ο όρος «μυκοτοξίνες» είναι σύνθετος, και προέρχεται από την ελληνική λέξη «μύκης (myces)», που σημαίνει μύκητας και την λατινική λέξη «toxicum» που σημαίνει τοξικός. Ιστορικά, οι μυκοτοξίνες έχουν θεωρηθεί ως η αιτία της τελευταίας από τις 10 πληγές της Αιγύπτου, σύμφωνα με την οποία, ο μεγαλύτερος γιος, η οικογένειά του και τα ζώα υπέκυψαν, μετά το άνοιγμα των εγκαταστάσεων αποθήκευσης σιτηρών, το περιεχόμενο των οποίων είχε μολυνθεί από τοξικούς μύκητες (Mars and Malloy, 1996). Η πιο πειστική απόδειξη των ιστορικών αναφορών μυκοτοξικών, είναι ασθένειες που έπληξαν πολλές περιοχές της Ευρώπης τον 10<sup>ο</sup> αιώνα, όπως αυτή του Αγ. Αντωνίου ή Αγία Φωτιά, που θεωρείται ότι είχε προκληθεί από την κατανάλωση σίκαλης μολυσμένης με αλκαλοειδή ερυσιβώδους (εργοτισμός)

από τον μύκητα *Claviceps purpurea*. Κατά τη διάρκεια των δεκαετιών του 1940 και 1950, είχαμε επεισόδια θανατηφόρων περιστατικών στη Ρωσία, κυρίως κατά τη διάρκεια των πρώτων ετών του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου. Αυτή η κατάσταση ήταν καλά καταγεγραμμένη και αναφέρεται ως «Διατροφική Τοξική Αλευκία». Πρόκειται για την παθολογική κατάσταση με τα νεκρωτικά και αιμορραγικά αποτελέσματα, καθώς και με τις επιπτώσεις στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Κ.Ν.Σ.) που οδηγούν συχνά στο θάνατο, και η οποία αναγνωρίστηκε ως τοξική εκδήλωση της μόλυνσης από την κατανάλωση μουχλιασμένων σπόρων (Richard, 2003). Ωστόσο ο υπεύθυνος αιτιολογικός τοξικός παράγοντας δεν βρέθηκε εκείνη την περίοδο, αλλά αργότερα, καθώς ανακαλύφθηκε ότι προκλήθηκε από τοξίνες T-2 που αποδόθηκαν στον μύκητα *Fusarium sporotrichioides*, ο οποίος και απομονώθηκε από μολυσμένους κόκκους.

### 2.2.2. Οι κυριότερες μυκοτοξίνες

Οι κυριότερες γνωστές ομάδες μυκοτοξινών είναι οι Αφλατοξίνες (aflatoxins), η Ζεαραλενόνη (zearalenone), οι Τριχοθεσίνες (trichothecenes), η Ωχροτοξίνη Α (ochratoxin A), και οι Φουμονισίνες (fumonisins) (Πίνακας 1). Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα κυριότερα είδη μυκήτων, οι μυκοτοξίνες που παράγουν και οι κυριότεροι μεταβολίτες των μυκοτοξινών στον οργανισμό.

**Πίνακας 1:** Είδη μυκήτων, μυκοτοξίνες που παράγουν και κυριότεροι μεταβολίτες των μυκοτοξινών στον οργανισμό (Πηγή: Κουρουσέκος, 2008)

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

### 2.2.3. Χαρακτηριστικά των μυκοτοξινών

Οι μυκοτοξίνες είναι μία ομάδα χημικών ενώσεων που θεωρούνται δευτερογενή προϊόντα μεταβολισμού διαφόρων γενών μυκήτων, τα οποία, είτε σχηματίζονται προς το τέλος της εκθετικής και στατικής φάσης ανάπτυξης του μύκητα και δεν παρεμβάλλονται βιοχημικά στην αύξηση ή την ανάπτυξή του (Smith and Anderson, 1991), είτε κατακρατούνται στο εσωτερικό του κυττάρου των μυκήτων και ελευθερώνονται μετά την θραύση του μικκυλίου. Εμφανίζουν συγγενείς μεταξύ τους χημικές ιδιότητες. Αυτοί οι μεταβολίτες αποτελούν μία τοξινογόνο και χημικά ετερογενή συνάθροιση, που αποτελείται από μέλη που μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια και θάνατο ανθρώπων και άλλων σπονδυλωτών. Μπορούν να παραχθούν σε ένα ευρύ φάσμα προϊόντων και κάτω από επίσης ευρύ φάσμα καταστάσεων, ενώ τα τρόφιμα που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο είναι τα φυτά μεγάλης καλλιέργειας. Οι μύκητες που τις παράγουν περιλαμβάνουν σαπρόφυτα που αναπτύσσονται σε μη-ζώντα οργανικά υποστρώματα, όπως παρασκευασμένα τρόφιμα και φυτική ύλη, παθογόνα των φυτών που σχετίζονται με την καλλιέργεια κτηνοτροφικών φυτών ή/και ενδοφύτων που αναπτύσσουν μία περίπλοκη συμβιωτική σχέση με ένα φυτό (Eaton and Groopman, 1994). Ένα σημαντικό στοιχείο αποτελεί το γεγονός ότι είναι δραστικές, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, παράμετρος που είναι η πιο σημαντική στην τοξικολογία (Nielsen, 1998).

Ένα μεγάλο ποσοστό της συνολικής βιομάζας στη γη αποτελείται από μύκητες. Ο αριθμός των ειδών των μυκήτων υπολογίζεται σε πάνω από 100.000 με τα είδη που παράγουν μυκοτοξίνες στις ζωοτροφές, να είναι σχετικά λίγα, περίπου 220. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 300 έως 400 μυκοτοξίνες, ενώ τουλάχιστον 300 έχουν ήδη παραχθεί εργαστηριακά από καλλιέργειες μυκήτων (Bennett and Klich 2003). Ένας μικρός σχετικά αριθμός από αυτές έχουν εντοπιστεί στα τρόφιμα (Murphy et al., 2006). Είναι οργανικές χημικές ουσίες, αλειφατικές ή κυκλικές, απλής σχετικά δομής, με απλό αριθμό ατόμων άνθρακα, χαμηλού μοριακού βάρους και παρόμοιες ιδιότητες. Είναι παράγωγα ή συγγενείς ενώσεις με την κουμαρίνη, τα τερπενοειδή, τα μακρολίδια και τα στεροειδή, έχουν διάφορες χημικές δομές και συνεπώς προκαλούν διάφορες βιολογικές επιπτώσεις στην υγεία τόσο των ανθρώπων, όσο και των ζώων. Ποικίλλουν από απλές ενώσεις με 4 άτομα άνθρακα, όπως η μονιλιφορμίνη, έως πολύπλοκες ενώσεις, όπως οι φομοψίνες (Dinis et al., 2007).

Είναι εξαιρετικά επικίνδυνες ενώσεις, αφού παραμένουν δραστικές για μεγάλο χρονικό διάστημα και μετά την καταστροφή των μυκήτων από τους οποίους παράχθηκαν. Επιπλέον, επειδή πολλές από αυτές είναι θερμοανθεκτικές, δεν καταστρέφονται στις συνήθεις συνθήκες θερμικής κατεργασίας των τροφίμων. Οι συγκεντρώσεις των μυκοτοξινών οι οποίες είναι σημαντικές για την υγεία των ζώων και των ανθρώπων, μετριούνται συνήθως σε  $\mu\text{g}/\text{kg}$  τροφής (ppb). Οι μυκοτοξίνες ταξινομούνται ως ο πιο σημαντικός, μη-μολυσματικός, χρόνιος παράγοντας διατροφικού κινδύνου, υψηλότερος από τα συνθετικά, τις φυτικές τοξίνες, τα πρόσθετα και τα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Αναγνωρίζονται στην ανάλυση επικινδυνότητας των μελετών της Ανάλυσης Επικινδυνότητας στα Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου (Hazard Analysis Critical Control Point, HACCP), ως πιθανός κίνδυνος. Όπως είναι γεγονός για τους περισσότερους δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων, οι λόγοι παραγωγής τους είναι άγνωστοι (Visconti and Perone, 2008) και μόνο πρόσφατα έχει αρχίσει η διερεύνησή τους.

Αρκετοί μύκητες είναι ικανοί να παράγουν περισσότερες από μία μυκοτοξίνες, ενώ μερικές μυκοτοξίνες παράγονται από περισσότερα από ένα είδη μυκήτων. Δεν είναι όλοι οι μύκητες τοξικοί και δεν είναι όλοι οι δευτερογενείς μεταβολίτες τους τοξικοί. Υπάρχουν πειστικά στοιχεία που να δείχνουν ότι, όσο πιο περίπλοκο είναι το μονοπάτι της σύνθεσης μιας συγκεκριμένης μυκοτοξίνης, τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των ειδών μυκήτων που παράγουν την ένωση. Επίσης, πολύ συχνά, περισσότερες από μία μυκοτοξίνες ανιχνεύονται σε ένα μολυσμένο υπόστρωμα.

Ενώ όλες οι μυκοτοξίνες είναι μυκητιακής προέλευσης, δεν είναι όλες οι τοξικές ενώσεις που παράγονται από μύκητες, μυκοτοξίνες. Ο στόχος και η συγκέντρωση του μεταβολίτη είναι πολύ σημαντικές παράμετροι διάκρισης. Προϊόντα μυκήτων που είναι τοξικά για τα βακτήρια, καλούνται αντιβιοτικά, ενώ αντίστοιχα, προϊόντα μυκήτων που είναι τοξικά για τα φυτά, καλούνται φυτοτοξίνες. Οι μυκοτοξίνες είναι τοξικές για τα σπονδυλωτά και για άλλες ομάδες ζώων, ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις. Άλλοι χαμηλού μοριακού βάρους μεταβολίτες μυκήτων, όπως η αιθανόλη, που είναι τοξικοί μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις, δεν θεωρούνται μυκοτοξίνες (Bennett, 1987). Προκαλούν απώλειες εκατομμυρίων δολαρίων κάθε χρόνο, παγκοσμίως, που αφορούν την ανθρώπινη υγεία, την υγεία των ζώων και τα απορριφθέντα αγροτικά προϊόντα. Οι κίνδυνοι για την υγεία από τις



μυκοτοξίνες, στους ανθρώπους ή τα ζώα έχουν αναθεωρηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια (Yaling et al., 2008; Averkieva, 2009).

## **2.2.4. Παραγωγή μυκοτοξινών**

### **2.2.4.1. Παραγωγή μυκοτοξινών στα φυτά**

Υπάρχουν δύο γενικές κατηγορίες μυκήτων, αυτοί που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας των φυτών και αυτοί που αναπτύσσονται κατά την αποθήκευση των καρπών, ιδιαίτερα των δημητριακών (Wilson and Abramson 1992, Dieber et al, 1998, Richard et al., 2007). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν κυρίως, μύκητες του γένους *Fusarium* spp. Απαιτούν υψηλή σχετική υγρασία (>70%), και υγρασία καρπού (>23%)-ενεργότητα νερού ( $a_w$ ), για να αναπτυχθούν (Xu et al., 2007). Οι μύκητες της κατηγορίας αυτής προκαλούν συχνά το θάνατο των ωαρίων και των εμβρύων των ζώων.

Οι μύκητες της δεύτερης κατηγορίας, ανήκουν κυρίως στα γένη *Aspergillus* spp. και *Penicillium* spp., και αναπτύσσονται έντονα σε ακατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης (π.χ. όταν δεν πραγματοποιείται ξήρανση των δημητριακών καρπών, που έχουν έτσι υγρασία >14%) (Christensen and Kaufmann, 1965). Ο μύκητας *Aspergillus flavus* αποτελεί ίσως ξεχωριστή περίπτωση, καθώς ενώ ανήκει στη δεύτερη κατηγορία, εντούτοις είναι δυνατό να παράγει υψηλές συγκεντρώσεις αφλατοξινών σε καρπούς, πριν από τη συγκομιδή και την αποθήκευσή τους (Osweiler, 1999; Taylor, 1999). Είναι θεμελιώδους σημασίας να διατηρηθεί ένα χαμηλό και ομοιόμορφο επίπεδο υγρασίας των σιτηρών, επειδή η ακανόνιστη υγρασία της μάζας, η οποία επιτείνεται με παρασκευή μείγματος από διαφορετικές παρτίδες, ευνοεί τη ανάπτυξη μυκήτων (Battilani, 2004). Οι μύκητες των παραπάνω γενών είναι γενικά ευρέως διαδεδομένοι στη φύση και έχουν απομονωθεί από αποσυντιθέμενη βλάστηση, από το έδαφος, και από τα διάφορα τρόφιμα (Wegst and Lingens, 1983). Οι μύκητες παράγουν τοξίνες κάτω από συνθήκες stress (απότομη αλλαγή στη θερμοκρασία, υγρασία, αερισμό), όπως επίσης και για να αμυνθούν έναντι άλλων μικροοργανισμών κατά τη διεκδίκηση της τροφής.

Η παραγωγή μυκοτοξινών επηρεάζεται από την εποχή του έτους και από την γεωγραφική εξάπλωση των αντίστοιχων μυκήτων. Ορισμένες περιοχές χαρακτηρίζονται ως υψηλού κινδύνου για την παραγωγή συγκεκριμένων

μυκοτοξινών. Ωστόσο, αυτή η γεωγραφική κατανομή είναι δυνατό να μεταβληθεί, ως αποτέλεσμα μεταβολής των περιβαλλοντικών συνθηκών (π.χ. λόγω έντονων και αιφνίδιων κλιματολογικών μεταβολών κ.τ.λ.), όπως συμβαίνει σε περιόδους έντονου ψύχους ή ξηρασίας, καθώς επίσης και λόγω των καταστροφών που προκαλούνται στους καρπούς από προσβολές εντόμων. Επιπλέον, η μεταφορά των δημητριακών καρπών σε μεγάλες αποστάσεις, όπως επίσης και η ανάμιξη και αποθήκευσή τους σε ακατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας είναι δυνατό να μεταβάλλουν τη γεωγραφική κατανομή σε ότι αφορά στη συχνότητα εμφάνισης συγκεκριμένων μυκοτοξινώσεων (Osweiler, 1999; WHO-FAO, 2001; Richard et al., 2007).

Η ανάπτυξη των μυκήτων και κατά συνέπεια η παραγωγή των αντίστοιχων τοξινών απαιτεί την ύπαρξη υδατανθράκων (που περιέχονται στους δημητριακούς καρπούς), επάρκεια σε υγρασία (>13%) και οξυγόνο, καθώς και κατάλληλη θερμοκρασία (συνήθως μεταξύ 12-25° C). (Wilson and Abramson 1992; Αλεξόπουλος, 1997; Xu et al., 2007). Κρίσιμο σημείο είναι επίσης και ο χρόνος κατά τον οποίο ένα προϊόν παραμένει κάτω από δυσμενείς συνθήκες (Belli et al., 2004; Mitchell et al., 2004; Belli et al., 2005). Παράγοντες καταπόνησης των φυτών (π.χ. ξηρασία, υψηλές θερμοκρασίες, καταστροφές λόγω προσβολών από έντομα, μηχανικές καταστροφές κατά τη συγκομιδή κ.ά.), προδιαθέτουν στην ανάπτυξη τοξινογόνων μυκήτων στα καλλιεργούμενα φυτά και τη μετέπειτα παραγωγή μυκοτοξινών (Richard and Cole, 1989; Omniski et al., 1994). Ο Tanbenghaus (1920), κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα έντομα που εισβάλλουν στη ρόκα του καλαμποκιού, μέσα από τις οπές στις φλούδες, συμβάλλουν ουσιαστικά στη μόλυνση από μύκητες. Τα έντομα με το μεταβολισμό τους αυξάνουν την υγρασία και τη θερμοκρασία του υποστρώματος και έτσι διασπούν το προστατευτικό εξωτερικό μέρος του φυτού. Μονοκαλλιέργεια και χρησιμοποίηση υβριδίων ακατάλληλων για την καλλιεργούμενη περιοχή, με μικρή ανθεκτικότητα στην επίθεση εντόμων, αποτελούν προδιαθέτοντες παράγοντες για την παραγωγή αφλατοξινών. Άλλοι παράγοντες, όπως η μη κατάλληλη πυκνότητα σποράς και το αμμώδες έδαφος, ο μη αποτελεσματικός έλεγχος των εντόμων και η υπερβολική γονιμότητα, που συνδέεται με την περιεκτικότητα σε άζωτο, αυξάνουν τη συσσώρευση μυκοτοξινών. Επίσης, μηχανικοί παράγοντες (το εσωτερικό μέρος του λαχανικού είναι πιο ευάλωτο στη δράση των μυκήτων, συγκριτικά με το εξωτερικό μέρος), οι τραυματισμοί που προξενεί η βροχή, η διαθεσιμότητα των μεταλλικών συστατικών και των ιχνοστοιχείων, το pH (γενικά οι μύκητες είναι περισσότερο ανθεκτικοί σε όξινα μέσα

και συχνά ικανοί να καταστήσουν το pH των υποστρωμάτων όξινο), φυσικοί και χημικοί χειρισμοί ορισμένων αγροτικών προϊόντων, και τέλος, η επανύγραση και αποξήρανση των προϊόντων (Abrams et al., 1987; Chelack et al., 1991; Gimeno, 2000; Eskola, 2002; Atalla et al., 2003; Magan et al., 2003). Πράγματι, η γνώση όλων των παραγόντων που εμπλέκονται στην παραγωγή των μυκοτοξινών και η αλληλεπίδρασή τους, επιτρέπει την πραγματοποίηση πιο ασφαλών προβλέψεων και την εφαρμογή καλύτερων μεθόδων πρόληψης, γι' αυτό και εκτελούνται πολλές μελέτες προς αυτή την κατεύθυνση (Suarez-Quiroz et al., 2004; Astoreca et al., 2007).

Υπάρχουν και περιπτώσεις συμβίωσης μυκήτων με φυτά, που οδηγούν στην παραγωγή ενώσεων που επιτρέπουν στο χορτάρι να αντέχει στρεστικές καταστάσεις, λόγω ασθένειας, εντόμων, προσβολών νηματωδών σκωλήκων και ξηρασίας, σε σύγκριση με τα ενδόφυτα χωρίς τους ομολόγους τους (Joost, 1995).

#### **2.2.4.2. Παραγωγή μυκοτοξινών στις ζωοτροφές**

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των ζωοτροφών, οι εναλλασσόμενες θερμές και ψυχρές συνθήκες θερμοκρασίας, ιδιαίτερα κατά την άνοιξη και το φθινόπωρο, διευκολύνουν την αύξηση της υγρασίας στο χώρο αποθήκευσης, και την ανάπτυξη των μυκήτων. Είναι σημαντικό να θυμόμαστε ότι, το επίπεδο της μόλυνσης είναι αθροιστικό, την ίδια ώρα που η χρονική στιγμή συγκομιδής και οι συνθήκες ξήρανσης και αποθήκευσης, μπορούν να παίξουν έναν εξίσου σημαντικό ρόλο στην παραγωγή μυκοτοξίνης.

Είναι έτσι προφανές, από τα παραπάνω, ότι η ύπαρξη μυκοτοξινών στις ζωοτροφές ή στα τρόφιμα προϋποθέτει την παρουσία μυκήτων. Για να αναπτυχθούν όμως οι μύκητες είναι απαραίτητη η παρουσία σπορίων τους στις πρώτες ύλες ή/και στα επεξεργασμένα τρόφιμα. Τα σπόρια (κονίδια), με τη σειρά τους, μεταφέρονται εύκολα με το νερό, τον αέρα ή/και τα έντομα, μολύνοντας έτσι τα φυτά, κατά τη διάρκεια της καλλιέργειάς τους, αλλά και τις αποθηκευμένες τροφές. Έτσι οι μυκοτοξίνες παράγονται τόσο από σαπροφυτικούς όσο και από ενδοφυτικούς μύκητες κατά την αποθήκευση και την ανάπτυξη των φυτών αντίστοιχα, εμφανίζοντας κατά κύριο λόγο λιπόφιλο χαρακτήρα, ιδιότητα που οδηγεί στη συσσώρευσή τους στους λιπώδεις ιστούς των φυτών και των ζώων (Eaton and Groopman, 1994). Οποιαδήποτε κατάσταση παρέχει μία πύλη εισόδου εντός του φυτικού ιστού –ξενιστή, ή παρεμβάλλεται στην ακεραιότητα του καλύμματος του σπόρου, επιτρέπει στον

μικροοργανισμό να εισέλθει και να αναπτυχθεί στον ιστό του ξενιστή. Οι υπεύθυνοι μύκητες γενικά αποικίζουν κατεστραμμένους πυρήνες, αλλά σε κάποιες περιπτώσεις παράγουν χρήσιμα ένζυμα, όπως η πηκτινάση, που τους επιτρέπουν να διεισδύσουν σε μη κατεστραμμένες ρόκες. Σε καλλιέργειες που επλήγησαν σοβαρά, κιτρινοπράσινες μάζες κονιδίων μπορεί να είναι ορατές στις περιοχές των κατεστραμμένων πυρήνων ή κατά μήκος των μονοπατιών που σχηματίστηκαν από τη διατροφή των εντόμων, που προηγήθηκαν.

Ωστόσο, δεν παρατηρείται καλή συσχέτιση ανάμεσα στην έκταση της μυκητιακής μόλυνσης και το επίπεδο των μυκοτοξινών που παράγεται στα προσβεβλημένα φυτά. Η αποτυχία εντοπισμού εμφανών μικκυλίων σε φρέσκα ή αποθηκευμένα προϊόντα δεν σημαίνει απαραίτητα και απουσία μυκοτοξίνης, ενώ αντίθετα η παρουσία μυκήτων δεν συνοδεύεται και από παραγωγή μυκοτοξινών από αυτούς (Diekman and Green, 1992). Η μακροσκοπική, έτσι, εξέταση των δημητριακών ή άλλων φυτών, που χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες ζωοτροφών, δεν μπορεί να θεωρηθεί ως αξιόπιστη μέθοδος για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την ύπαρξη μυκοτοξίνης και επομένως δεν μπορεί εύκολα να εκτιμηθεί εάν τα παραπάνω είναι ασφαλής για κατανάλωση από τα ζώα (WHO-FAO 2001).

Γενικά, τα επίπεδα παραγωγής των μυκοτοξινών ποικίλουν όχι μόνον μεταξύ των διαφόρων στελεχών του είδους του μύκητα, αλλά και σε συνάρτηση με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα (Nielsen, 1998). Οι μυκοτοξίνες συνθέτονται από μύκητες που αναπτύσσονται στα προϊόντα φυτικής προέλευσης, όπως τα δημητριακά και ιδιαίτερα το καλαμπόκι, τα σιτηρά, τη βρώμη, το κριθάρι, αλλά και τη σόγια, το βαμβακόσπορο, τα φιστίκια και τα φρούτα, κυρίως όταν αυτά αποθηκεύονται κάτω από συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας και θερμοκρασίας (Βάσσος, 2004). Επιπλέον, εξαιτίας της πραγματικά αξιοσημείωτης σταθερότητάς τους στη θέρμανση και σε άλλου είδους επεξεργασίες, δύνανται να παραμείνουν στα τρόφιμα για μεγάλο χρονικό διάστημα (Eaton and Groopman, 1994). Πράγματι, οι τελευταίες αποδεικνύονται ιδιαίτερα σταθερές και ανθεκτικές κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας των προσβεβλημένων τροφίμων (Scott 1984,1991).

Η μοναδική φυσιολογία των μηρυκαστικών, η οποία χαρακτηρίζεται από ζύμωση και πέψη των συστατικών των φυτών, όπως η κυτταρίνη, από τα μικρόβια που περιλαμβάνονται στη γλωρίδα των προστομάχων, απαιτεί την παρουσία στη διατροφή τους επαρκών ποσοτήτων χονδροειδούς ζωοτροφής, προκειμένου να

διατηρηθεί μία λειτουργική ισορροπία στη μεγάλη κοιλία. Η γενετική επιλογή για ζώα υψηλών αποδόσεων σε γάλα, κατέστησε αναγκαίο να προστεθούν στη διατροφή των μηρυκαστικών, αυξημένες ποσότητες εύπεπτων συστατικών, πλούσιων σε ενέργεια. Στην εκτατική κτηνοτροφία, η βόσκηση καλύπτει ένα μεγάλο μέρος του σιτηρεσίου, και η πρόσληψη συμπυκνωμάτων περιορίζεται σε ένα μικρό ποσοστό της συνολικά καταναλισκόμενης ζωοτροφής. Αντίθετα, σε βοοειδή ή πρόβατα γαλακτοπαραγωγής, τα συμπυκνώματα μπορούν να καλύπτουν μέχρι και το 70% του ημερήσιου σιτηρεσίου. Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται ο κίνδυνος έκθεσης σε ένα σύμπλεγμα μυκοτοξινών.

Η πρώτη ταυτοποιημένη πηγή μυκοτοξινών σε σιτηρέσια μηρυκαστικών, ήταν η μόλυνση των συμπυκνωμάτων με αφλατοξίνες. Την ίδια στιγμή, τα μηρυκαστικά μπορούν να εκτεθούν σε εντελώς διαφορετικές κατηγορίες μυκοτοξινών, που αναπτύσσονται σε χόρτα βοσκοτόπων, με το επίπεδο μόλυνσης να εμφανίζει σημαντικές γεωγραφικές διαφορές (Cheece, 1995). Η τρίτη πηγή μυκοτοξινών στη διατροφή των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων και προβάτων, εντοπίζεται στην κατανάλωση επεξεργασμένων και αποθηκευμένων ζωοτροφών, όπως η ενσίρωση, ο σανός και το άχυρο (O' Brien et al., 2005; Mansfield and Kuldan, 2007). Ιδιαίτερα μετά την πάροδο μεγάλου χρονικού διαστήματος αποθήκευσης, το ενσίρωμα μπορεί να καταστραφεί από μία ποικιλία ειδών μυκήτων τα οποία είναι οξεάντοχα και μικροαερόφιλα. Έρευνες εντόπισαν μύκητες των γενών *Penicillium* spp., όπως *P. roqueforti*, *P. paneum*, *Aspergilli* (*A. Fumigatus* & *A. flavus*), (Cole et al., 1977), *Monascus* spp. (Shneweis et al., 2001) και *Byssochlamus nivea* (Escoula, 1975), ως τα πιο διαδεδομένα είδη μυκήτων ενσίρωσης. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι μυκοτοξίνες που προέρχονται από μόλυνση πριν τη συγκομιδή των ζωοτροφών που ενσιρώνονται, προστίθενται στη συνολική παραγωγή μυκοτοξινών μόλυνσης.

Η μόλυνση των ζωοτροφών με μυκοτοξίνες αποτελεί ένα ζήτημα που προκαλεί αυξανόμενη ανησυχία καθώς σχετίζεται τόσο με τις αλλαγές στις γεωργικές πρακτικές, όσο και με τις κλιματικές αλλαγές που φαίνεται να προκαλούν, αύξηση του επιπολασμού της μόλυνσης από μυκοτοξίνες. Επίσης εγείρουν ανεπιθύμητα εμπόδια στο εμπόριο πρώτων υλών και αναλώσιμων προϊόντων (Wu, 2006). Σύμφωνα με δεδομένα του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) των Ηνωμένων Εθνών, το 25% της ετήσιας παγκόσμιας παραγωγής δημητριακών περιέχει μυκοτοξίνες (CAST, 1989). Τα τελευταία χρόνια φαίνεται ότι έχει αυξηθεί η συχνότητα μόλυνσης των τροφών σε παγκόσμια κλίμακα, γεγονός που μπορεί να

οφείλεται, εν μέρει, στον αυξημένο έλεγχο των ύποπτων υλών και την αυξημένη επαγρύπνηση. Ακόμη και η παγκοσμιοποίηση του διεθνούς εμπορίου των πρώτων υλών επιδείνωσε το πρόβλημα, καθώς υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα, μία συγκεκριμένη τροφή να περιέχει συστατικά που να προέρχονται από διαφορετικές περιοχές.

### **2.2.5. Επιπτώσεις των μυκοτοξινών στην υγεία των ζώων**

Οι περισσότερες παθολογικές καταστάσεις λόγω μυκοτοξινών, σχετίζονται με την κατανάλωση μολυσμένων δημητριακών καρπών και σπανιότερα με την εισπνοή τους ή την άμεση τοξική δράση τους στο δέρμα (Osweiler 1999; Richard 2007), δηλ. μέσω του αέρα ή της μολυσμένης σκόνης (Jarvis, 2002).

Πειραματικά δεδομένα και κλινική εμπειρία δείχνουν ότι τα μηρυκαστικά είναι λιγότερο ευάλωτα, απ' ό,τι άλλα είδη ζώων στις δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία που συνδέονται με την έκθεση στις μυκοτοξίνες. Αυτή η υπόθεση βασίζεται στην διαπίστωση ότι η μικροχλωρίδα της μεγάλης κοιλίας μπορεί να μετατρέψει μία σειρά από μυκοτοξίνες σε μεταβολίτες, που είναι λιγότερο ισχυροί ή ακόμη και βιολογικά αδρανείς στα κοινά επίπεδα έκθεσης. Αυτό δεν ισχύει ωστόσο σε όλες τις μυκοτοξίνες που μολύνουν πρώτες ύλες ζωοτροφών. Έτσι πολλά βακτήρια αναστέλλονται εντελώς παρουσία συγκεντρώσεων περί τα 10 µg/AFB1/ml, γεγονός που υποδηλώνει ότι η τοξίνη θα μπορούσε να διαταράξει την ανάπτυξη και τη μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών των προστομάχων (Yiannikouris and Jouany, 2002). Επίσης, καθώς τα συγκεκριμένα ζώα βόσκουν, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να καταπίνουν όλο και περισσότερα υλικά του εδάφους, σε σύγκριση με τα άλλα ζώα, όπως οι άργιοι, υλικά τα οποία θα μπορούσαν να συμβάλλουν και να οδηγήσουν τα ίδια στη μείωση του κινδύνου που ενέχουν οι μυκοτοξίνες για τα μηρυκαστικά.

Τα κλινικά τοξικολογικά συμπτώματα που προκαλούνται από την κατάποση μέτριων ως υψηλών ποσοτήτων μυκοτοξινών κυμαίνονται από την οξεία θνησιμότητα μέχρι την αργή αύξηση και την μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα (Berry, 1988; Neldon-Ortiz and Quereshi, 1991). Κατανάλωση μικρών ποσοτήτων μυκοτοξινών μπορεί να επιφέρει εξασθένηση της ανοσίας και μείωση της αντίστασης σε μολυσματικές ασθένειες. Είναι γνωστό από παλιά στους κτηνιάτρους ότι η κατάποση μυκοτοξινών σε επίπεδα μικρότερα από αυτά που προκαλούν τοξικότητα,

εμφανίζει ανοσοκαταστολή στα ζώα (Richard et al., 1978). Η ανοσοκαταστολή που προκαλείται από τις μυκοτοξίνες εκφράζεται σαν μειωμένη δραστηριότητα των T και B λεμφοκυττάρων, μειωμένη παραγωγή αντισωμάτων και εξασθενημένες λειτουργίες των μακροφάγων και ουδετερόφιλων. Η καταστολή της λειτουργίας του ανοσοποιητικού από τις μυκοτοξίνες μπορεί να ενεργοποιήσει χρόνιες μολύνσεις ή να ελαττώσει τη δραστηριότητα των εμβολίων και φαρμάκων. Πολλές αναφορές δείχνουν ότι οι μυκοτοξίνες είναι ικανές να επηρεάσουν την φλεγμονώδη αντίδραση. Μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τη βιωσιμότητα των φαγοκυττάρων ή εναλλακτικά να εξασθενήσουν τη δράση ή τις εκκριτικές λειτουργίες αυτών των κυττάρων. Έχει βρεθεί ότι πολλές μυκοτοξίνες επηρεάζουν την χυμική ανοσία (Oswald and Comera, 1998; Bondy and Pestka, 2000). Ξεχωριστό ενδιαφέρον παρουσιάζει η δράση της δεοξυνιβαλενόλης (DON), που ονομάζεται επίσης και βομιτοξίνη, στη σύνθεση των αντισωμάτων. Σαν επακόλουθο όλων των παραπάνω, μία αυξημένη παρατηρούμενη συχνότητα εμφάνισης μαστίτιδας και μία αντίστοιχη συχνότητα εμφάνισης προβλημάτων στα άκρα αγελάδων γαλακτοπαραγωγής, θεωρήθηκε ότι σχετιζόταν με κακή ποιότητα ενσιρώματος (Nyman et al., 2007).

Οι Kiessling et al. το 1984 διατύπωσαν την άποψη ότι, τα μηρυκαστικά αναπτύσσουν λιγότερο συχνά μυκοτοξινώσεις, καθώς η χλωρίδα των προστομάχων τους δρα ως πρώτη γραμμή άμυνας εναντίον τους. Για παράδειγμα, η ωχρατοξίνη A (OTA), μετατρέπεται ταχέως στη λιγότερο τοξική ωχρατοξίνη α, (που στερείται το ήμισυ της φαινυλαλανίνης) από τη χλωρίδα (πρωτόζωα) του προστομάχου και μόνο πολύ μικρές ποσότητες ανέπαφης OTA απορροφώνται. Έτσι, in vitro μελέτες έδειξαν ότι σε υγιή βοοειδή, μέχρι 12mg OTA/kg τροφής, θα μπορούσαν να αδρανοποιηθούν (Hult et al., 1976; Pettersson et al., 1982). Επίσης, το πρόβατο θεωρείται ανθεκτικότερο της αγελάδας. Δραστικές αλλαγές στη σύνθεση του σιτηρεσίου με ένα υψηλό ποσοστό συμπυκνωμάτων, πλούσιων σε πρωτεΐνες, μπορούν να επηρεάσουν την ικανότητα διάσπασης των μικροοργανισμών των προστομάχων (Xiao et al., 1991; Muller et al., 2001), γεγονός που εξηγεί γιατί μικρά ποσά OTA μπορούν να ανιχνευθούν στο γάλα (Skang, 1999).

Η έκθεση των μηρυκαστικών σε αφλατοξίνες έχει σαν αποτέλεσμα την βλάβη και εξασθένηση της ηπατικής λειτουργίας και τη μείωση της πρόσληψης τροφής, η οποία με τη σειρά της μπορεί να εξηγήσει την πτώση της γαλακτοπαραγωγής στις γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες. Η εξασθένηση των ηπατικών λειτουργιών μπορεί επίσης να είναι υπεύθυνη για την φωτοευαισθησία που επίσης συνοδεύει την εν λόγω

έκθεση (Miller and Wilson, 1994). Το γεγονός ότι το γάλα αποτελεί ένα προϊόν-είδος πρώτης ανάγκης που απευθύνεται στο ευρύ καταναλωτικό κοινό (στο οποίο περιλαμβάνονται και ιδιαίτερα ευπαθείς ομάδες), σε συνδυασμό με τις καρκινογόνες ιδιότητες των αφλατοξινών, καθιστούν ιδιαίτερα σημαντικό τον έλεγχο των AFB<sub>1</sub> και AFM<sub>1</sub> στα μηρυκαστικά.

Οι μυκοτοξικώσεις αναφέρονται εδώ και πολλά χρόνια ως αιτιολογικοί παράγοντες πρόκλησης απωλειών στην πτηνοτροφία. Τα πτηνά είναι ευαίσθητα στην μόλυνση κυρίως από τις αφλατοξίνες, την OTA καθώς και τις τριχοθεσίνες T2. Η ανίχνευση AFB<sub>1</sub>, OTA και τριχοθεσινών συνδυάζεται με αυξημένα περιστατικά σαλμονέλωσης και κοκκιδίωσης, λόγω ανοσοκαταστολής. Επίσης ακολουθείται από απώλεια βάρους, καθυστέρηση ανάπτυξης των ορνιθίων, αιμορραγίες και νεκρώσεις ιστών (Smith και συν. 1992). Τέλος ο χοίρος, και ιδιαίτερα οι σύες, συγκαταλέγονται στα πλέον ευπαθή είδη ζώων, στη μόλυνση από μυκοτοξίνες. Σε αυτό το είδος παρατηρείται από μείωση της ημερήσιας αύξησης βάρους και βλάβες στα ηπατικά κύτταρα (Southern and Clawson 1979) μέχρι διαταραχές της νεφρικής λειτουργίας, και κινητική δυσλειτουργία στην ωχρατοξίκωση των συών. Η ζεαραλενόνη συνδέεται επίσης άμεσα με διαταραχές της λειτουργίας του αναπαραγωγικού συστήματος των συών, καθώς αυτή και οι μεταβολίτες της, λόγω της χημικής ομοιότητάς τους με την οιστραδιόλη 17-β, έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τους υποδοχείς των οιστρογόνων (Hurd 1977).

Οι αλληλεπιδράσεις των μυκοτοξινών όταν αυτές καταναλώνονται ταυτόχρονα, δεν έχουν ακόμη διερευνηθεί σε μεγάλη έκταση. Σε πολλές περιπτώσεις, οι αντιδράσεις αυτές είναι δυνατό να μεταβάλλονται ανάλογα με το είδος του ζώου, καθώς η ευαισθησία έναντι των τοξινών αυτών ποικίλει. Η συνύπαρξη ορισμένων μυκοτοξινών είναι δυνατό να αυξήσει την τοξική τους δράση, και σε ορισμένες περιπτώσεις να επιταχύνει την εμφάνιση αθροιστικής δράσης. Για παράδειγμα, έντονη αθροιστική δράση έχει παρατηρηθεί μετά από κατανάλωση σιτηρεσίου στο οποίο συνυπάρχουν αφλατοξίνες και OTA (Huff et al., 1988; Harvey et al., 1989α).

Από την άλλη μεριά, έχει γίνει γνωστό, μέσω διαφόρων εργασιών, πως οι ιστοί που μολύνονται με τοξικογόνο μύκητα, είναι πιο τοξικοί από ιστούς στους οποίους έχει γίνει τεχνητή έγχυση της ίδιας ποσότητας μυκοτοξίνης. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στο ότι, οι μύκητες είναι πιθανό να παράγουν διαφορετικούς, μη τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι όμως ενισχύουν τη δράση των μυκοτοξινών. Τα αποτελέσματα πρόσφατων ερευνών υποδεικνύουν πως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ



των μυκοτοξινών είναι πολύ σημαντικές και πιθανόν σημαντικότερες από τις επιδράσεις μεμονωμένων μυκοτοξινών (Diaz et al., 2011).

Συνοψίζοντας κάποιες από τις μυκοτοξίνες είναι καρκινογόνες (αφλατοξίνες, ωχρατοξίνη και φουμονισίνη), άλλες μεταλλαξιογόνες (αφλατοξίνες και στεριγματοκυστίνη), άλλες τερατογόνες (ωχρατοξίνη), οιστρογόνες (ζεαραλενόνη), αιμορραγικές (τριχοθυκένια), τοξικές για το ανοσοποιητικό σύστημα (αφλατοξίνες και ωχρατοξίνη), νεφροτοξικές (ωχρατοξίνη), ηπατοτοξικές (αφλατοξίνες), δερματοτοξικές (τριχοθυκένια) και νευροτοξικές (εργοτοξίνες). Η επίπτωση των μυκοτοξινών στην υγεία των ζώων εξαρτάται από την ποσότητα τους που καταναλώνεται, την τοξικότητα των επιμέρους συστατικών (πρόκληση οξείας ή χρόνιας παθολογικής κατάστασης), το ατομικό σωματικό βάρος, την ταυτόχρονη παρουσία και άλλων μυκοτοξινών (συνεργική δράση) και άλλους διατροφικούς παράγοντες.

Τέλος, εκτός από τις πολύ σοβαρές τοξικές επιπτώσεις των μυκοτοξινών στην υγεία, η μόλυνση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων με μυκοτοξίνες μπορεί επίσης να υποβαθμίσει και την ποιότητα του γάλακτος που προορίζεται για χρήση σε ζυμούμενα προϊόντα, όπως το γιαούρτι. Διάφορες μυκοτοξίνες, ιδιαίτερα εκείνων της ενσίρωσης, ασκούν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση και ακόμη και σε μικρές ποσότητες μπορούν να επηρεάσουν την τεχνολογία που χρησιμοποιείται για την παρασκευή τους, κατά τρόπο ανάλογο με τα ανεπιθύμητα υπολείμματα των θεραπευτικών αντιβιοτικών (ψευδώς θετικά αποτελέσματα).

#### **2.2.6. Ωχρατοξίνη A**

Η Ωχρατοξίνη A (OTA) παράγεται κυρίως από δύο είδη μύκητων, το *Penicillium verrucosum* και τον *Aspergillus ochraceus*. Ανακαλύφθηκε το 1965 ως μεταβολίτης του μύκητα *A. ochraceus* (Van de Merwe et al. 1965). Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας γι αυτήν αναθερμάνθηκε μετά το 1993, όταν ο Διεθνής Οργανισμός για την Έρευνα του Καρκίνου την κατέταξε στις Πιθανές Καρκινογόνες ουσίες (IARC 1993 α). Η OTA είναι ένα κυκλικό πεντακετίδιο, παράγωγο της διυδρο-ισοκουμαρίνης με L-φαινυλαλανίνη. Εμφανίζει μεγάλη αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες και στην επίδραση των οξέων. Έχει αποδειχθεί ότι σε κανονικές μαγειρικές συνθήκες αποδομείται μόνο μερικώς, ενώ συνθήκες αποστείρωσης, με την

εφαρμογή συνδυασμού υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας μέχρι και 250° C, δεν είναι ικανές να την καταστρέψουν τελείως (Khoury and Atoui, 2010).

Η ΟΤΑ εμφανίζει νεφροτοξική, ηπατοτοξική, ανοσοκατασταλτική και καρκινογόνο δράση (Varga et al., 2009). Έχει ανιχνευθεί στο γάλα του μύος, του κονίκλου και του ανθρώπου. Αντίθετα, πολύ μικρό κλάσμα της ΟΤΑ απεκκρίνεται με το γάλα των μηρυκαστικών γεγονός που αποδίδεται στο μεταβολισμό της από τη μικροβιακή χλωρίδα της μεγάλης κοιλίας τους (Creppy 2002). Τα νεαρά όμως μηρυκαστικά, κατά την περίοδο της γαλουχίας, δείχνουν ευαισθησία στη δράση της, ανάλογη με εκείνη των υπόλοιπων ζώων, επειδή λειτουργούν σε αυτή την φάση, ως μονογαστρικά (Krogh 1992). Η ευρεία χρήση του μύκητα *A. niger* για την παρασκευή κιτρικού οξέος και ορισμένων ενζύμων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση καθιστά εξαιρετικά σημαντικό τον έλεγχο για πιθανή παραγωγή ΟΤΑ (Teren et al., 1996). Εμφανίζεται συχνά σε σιτηρά, στον καφέ, στους ξηρούς καρπούς, στο κακάο, στην μύρα, στο κρασί και στα μπαχαρικά.

### 2.2.7. Τριχοθεσίνες

Είναι μυκοτοξίνες που παράγονται από μύκητες του γένους *Fusarium*. Τα είδη του γένους *Fusarium* είναι γνωστό ότι προσβάλλουν τα σιτηρά κατά την ανάπτυξη του φυτού και παράγουν τις επονομαζόμενες τοξίνες του αγρού. Οι μύκητες αυτοί είναι πιο κοινοί σε εύκρατα κλίματα και οι μυκοτοξίνες τους είναι οι πιο γνωστές και διαδεδομένες παγκοσμίως (Wood, 1992). Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 150 τριχοθεσίνες. Οι μυκοτοξίνες αυτές περιέχουν ένα εποξειδίο το οποίο ευθύνεται για τις περισσότερες από τις τοξικές δράσεις τους.

Η Δεοξυνιβαλενόλη (deoxynivalenol-DON) αποτελεί την πιο συχνά ανιχνεύσιμη τοξίνη του μύκητα *Fusarium*, η οποία και δρα συνήθως συνεργικά με τη νιβαλενόλη. Ονομάζεται επίσης και βομιτοξίνη (vomitoxin), καθώς ένας από τους κύριους τρόπους εκδήλωσης της δράσης της είναι η πρόκληση εμετού (vomiting). Παράγεται κυρίως από τους μύκητες *F. graminearum* και *F. culmorum*. Ο χοίρος, αποτελεί το είδος που είναι περισσότερο ευαίσθητο στη δράση της DON, σε σύγκριση με τα βοοειδή, τα πρόβατα και τα πτηνά (Patterson and Young 1992, 1993). Στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, η λήψη της είχε σαν αποτέλεσμα, αφενός την ανίχνυσή της στο γάλα (Prelusky et al., 1984) και αφετέρου τη μείωση της

γαλακτοπαραγωγής (Whitlow et al., 1994), παρότι υπάρχουν και αντίθετες απόψεις (Charmley και συν. 1993).

Η T2 τοξίνη παράγεται από τα ίδια είδη μυκήτων που παράγουν την DON, αλλά επιπλέον και από το είδος *F. sporotrichioides*. Μεταβολίτης της είναι η HT2 τοξίνη. Η T2 τοξίνη αναστέλλει τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Για αυτόν ακριβώς τον λόγο, τα κυριότερα συμπτώματα από τη δράση της προέρχονται από το ανοσοποιητικό σύστημα (μείωση της παραγωγής αντισωμάτων κ.ά.) (Creppy, 2002). Σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, η δράση της τοξίνης έχει σχετιστεί με εντερίτιδες, αιμορραγίες του πεπτικού σωλήνα, έλκη της μεγάλης κοιλίας και θάνατο (Weaver και συν. 1980). Επίσης αναφέρθηκε ότι στα μεγάλα μηρυκαστικά προκαλεί αποβολές, προς το τέλος της κύησης (Hsu και συν. 1972, Mann και συν. 1983). Στους χοίρους αναφέρονται προβλήματα γονιμότητας, αποβολές, μείωση του μεγέθους των τοκετομάδων και γεννήσεις ελλιποβαρών χοιριδίων (Harvey και συν. 1990).

#### **2.2.8. Ζεαραλενόνη**

Η Ζεαραλενόνη (ZEN) παράγεται από τα ίδια είδη του γένους *Fusarium* που παράγουν και την DON, χωρίς όμως να ανήκει στις τριχοθεσίνες. Συνυπάρχουν όμως με αυτές, στις προσβεβλημένες από τον μύκητα *Fusarium* ζωοτροφές (Diekman and Green, 1992). Η υψηλή υγρασία (23-25%) είναι απαραίτητη για την ανάπτυξή του (Jimenez et al., 1996). Η ατελής ξήρανση του καλαμποκιού και η εναλλαγή υψηλών και χαμηλών θερμοκρασιών περιβάλλοντος, ευνοούν την παραγωγή της ZEN (Fink-Gremmels and Malekinejad, 2007). Έτσι, πολύ συχνά αυτή παράγεται κατά την καλλιέργεια των δημητριακών καρπών, πριν τη συγκομιδή τους, χωρίς ωστόσο να αποκλείεται και ο σχηματισμός της, μετά την συγκομιδή (Scott, 1996; Ryu et al., 2003; Jouany, 2007; Zinedine et al., 2007). Η ZEN χαρακτηρίζεται ως μη στεροειδής οιστρογονική μυκοτοξίνη με ανάλογη δράση, επηρεάζοντας άμεσα την αναπαραγωγική δραστηριότητα. Μετά τη λήψη της μετατρέπεται γρήγορα, με τη δράση της μικροβιακής μικροχλωρίδας της μεγάλης κοιλίας, στους μεταβολίτες της  $\alpha$ - και  $\beta$ - ζεαραλενόλη ( $\alpha$ -ZEN &  $\beta$ -ZEN), οι οποίοι επίσης έχουν οιστρογονική δράση. Γενικά η συγκεκριμένη μυκοτοξίνη, σπάνια προκαλεί οξεία τοξίκωση, δημιουργεί όμως συχνά προβλήματα δεισλειτουργίας στο γεννητικό σύστημα, τόσο των χοίρων, όσο και των προβάτων.

### 2.2.9. Φουμονισίνες

Οι μύκητες *F. moniliforme* και *F. proliferatum* αναπτύσσονται κυρίως στο καλαμπόκι, παράγουν τις μυκοτοξίνες της ομάδας των φουμονισινών και εμφανίζουν παγκόσμια εξάπλωση. Οι μυκοτοξίνες αυτές παράγονται καθώς το φυτό του καλαμποκιού διανύει τα τελευταία στάδια της ανάπτυξής του, και πιο συγκεκριμένα όταν διέρχεται από μία περίοδο ήπιας ξηρασίας σε συνθήκες υψηλής υγρασίας (συνεχείς βροχοπτώσεις). Ωστόσο, πρέπει να σημειώσουμε, ότι δεν έχουν διερευνηθεί πλήρως όλοι οι παράγοντες που προδιαθέτουν στην παραγωγή των συγκεκριμένων τοξινών (Steyn 1995; Shephard et al., 1996; Gelderblom et al., 1988). Οι περισσότερες διαδεδομένες φουμονισίνες είναι οι B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> και B<sub>3</sub>, ουσίες που από χημικής απόψεως είναι, υδατοδιαλυτοί, θερμικά σταθεροί και ανθεκτικοί στα αλκάλια, αλειφατικοί υδρογονάνθρακες. Προκαλούν αναστολή της βιοσύνθεσης των σφιγγολιπιδίων που αποτελούν συστατικά των κυτταρικών και άλλων μεμβρανών, επιδρώντας με αυτόν τον τρόπο στην φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων (Norred et al., 1992; Riley et al., 1993; Ramasamy et al., 1995; Constable et al., 2003). Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι κάτω από την επίδραση των συγκεκριμένων μυκοτοξινών τα κύτταρα όλων των ιστών, πλην του εγκεφάλου, υφίστανται διαταραχή του μεταβολισμού των σφιγγολιπιδίων (Creppy 2002). Επίσης, οι φουμονισίνες εμφανίζουν κυτταροτοξική, ανοσοκατασταλτική (μέσω της διαταραχής του μεταβολισμού των κυτοκινών στα μακροφάγα) και ηπατοτοξική δράση (Liu et al., 2002; Oswald et al., 2003).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα της τοξικής δράσης της πιο ενδιαφέρουσας, κλινικά, φουμονισίνης B<sub>1</sub>, αποτελεί ο μηχανισμός δράσης της πάνω στα κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα, όπου φαίνεται να ευνοεί τον αποικισμό του εντέρου από διάφορα παθογόνα μικροβιακά στελέχη, όπως της *E. coli*, προδιαθέτοντας με αυτό τον τρόπο στην εμφάνιση των αντίστοιχων νοσημάτων (Oswald et al., 2003).

Η κατανάλωση φουμονισίνης προκαλεί: α) πνευμονικό οίδημα στους χοίρους, β) ηπατοτοξικότητα στους αρουραίους και γ) εγκεφαλομαλάκυνση στους ίππους (Dutton 1996; Norred et al., 1996). Ο ίππος αποτελεί το πλέον ευαίσθητο είδος. Στον άνθρωπο θεωρήθηκε πιθανή η σχέση της με την εκδήλωση καρκίνου του οισοφάγου, που παρατηρήθηκε στη Νότιο Αφρική (Rheeder et al., 1992), καθώς και καρκίνου του ήπατος που παρατηρήθηκε σε συγκεκριμένες περιοχές της Κίνας (Ueno et al., 1997). Για τον λόγο αυτό οι φουμονισίνες κατατάσσονται, από τον Διεθνή Οργανισμό

για την Έρευνα του Καρκίνου, στις καρκινογόνες ουσίες για τον άνθρωπο (IARC, 1993 β).

### 2.2.10. Άλλες μυκοτοξίνες

Ο μύκητας *Penicillium citrinum* και μερικά είδη *Aspergillus* (*A. terreus* και *A. niveus*) παράγουν την μυκοτοξίνη κιτρινίνη (citrinin) η οποία εμφανίζει νεφροτοξική δράση (Manabe, 2001).

Από μύκητες του γένους *Claviceps* παράγεται η μυκοτοξίνη Εργοτίνη που έχει συνδεθεί με γάγγραινα και προσβολή του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος στον άνθρωπο και τα ζώα (Lorenz 1979, Bennett και Bentley 1999). Τα αλκαλοειδή εργοτίνης (ergot alkaloids) προκαλούν οίδημα των άκρων, γάγγραινα και θάνατο (King, 1979), ή προσβάλλουν το κεντρικό νευρικό σύστημα και προκαλούν παραισθήσεις και παράλυση (Peraica et al., 1999).

Ο Εργοτισμός (Ergotism) είναι ίσως η παλαιότερη γνωστή μυκοτοξίκωση. Τα περιστατικά που έχουν συμβεί στον άνθρωπο συνδέονται με μόλυνση από τον *Claviceps purpurea*, μέσω αλεύρου σικάλεως, που ήταν ιδιαίτερα διαδεδομένο στην Κεντρική και Βόρεια Ευρώπη, στον Μεσαίωνα, όπως μία επιδημία που εκδηλώθηκε στη Λιμόζ της Γαλλίας, από την οποία πέθαναν 40.000 άνθρωποι. Σαν ασθένεια του ανθρώπου έχει ήδη σχεδόν εξαλειφθεί, εκτός από μεμονωμένα περιστατικά. Δύο χαρακτηριστικές μορφές εργοτισμού μπορούν να παρατηρηθούν στον άνθρωπο, ο γαγγραινώδης και σπασμωδικός εργοτισμός.

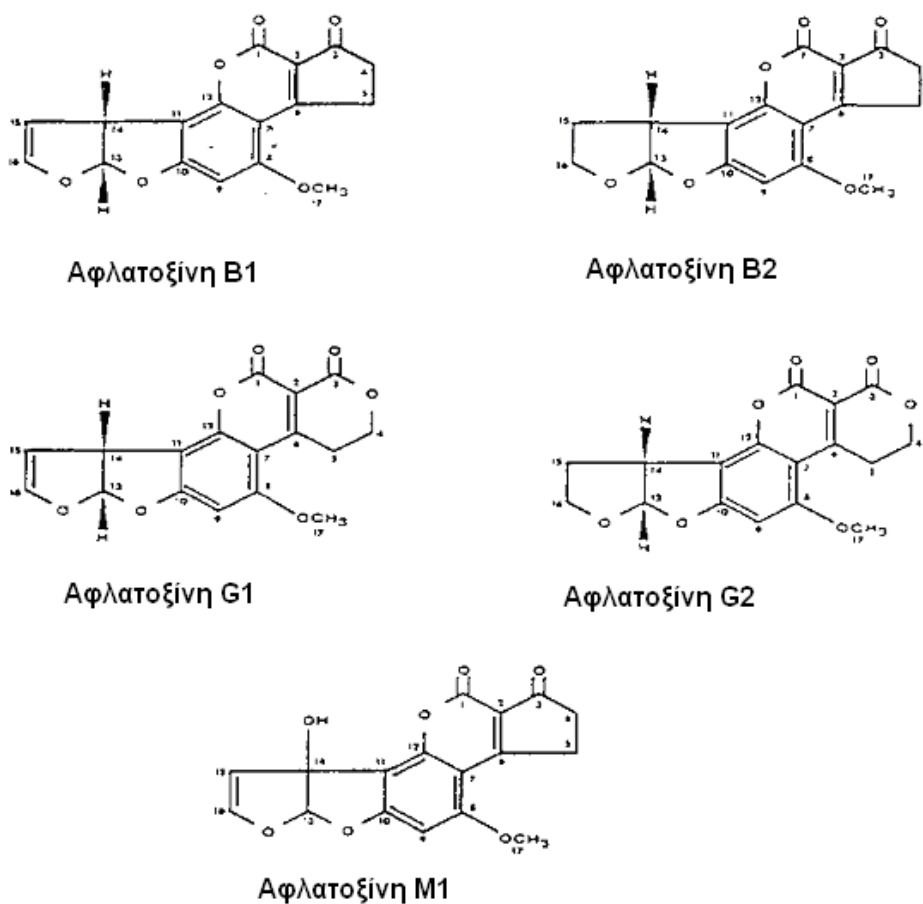
### 2.3. Αφλατοξίνες

Οι αφλατοξίνες αποτελούν την πιο μελετημένη ομάδα μυκοτοξινών. Η πρώτη απόδειξη της ύπαρξής τους τοποθετείται το 1960, όταν περισσότερες από 100.000 γαλοπούλες χάθηκαν στην Αγγλία μετά από κατανάλωση φιστικιών που είχαν εισαχθεί από την Αφρική και τη Βόρειο Αμερική. Από τα φιστίκια απομονώθηκε ο *Aspergillus flavus* και μία τοξίνη που παρήχθη από αυτόν, η οποία ονομάστηκε Αφλα-τοξίνη (Jay, 1996). Περίπου την ίδια περίοδο στις Η.Π.Α. παρατηρήθηκε μία έξαρση καρκίνου του ήπατος στις πέστροφες, η οποία αργότερα αποδόθηκε στη μόλυνση από αφλατοξίνες, ενός μίγματος βαμβακόσπορου, συστατικού της διατροφής αυτών των ψαριών. Θεωρούνται έντονα τοξικές προκαλώντας μεταξύ άλλων μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό, καρκίνο του ήπατος και ανοσοκαταστολή,

ενώ έχει αποδειχθεί και η συσχέτισή τους με άλλες ασθένειες, όπως η ηπατίτιδα Β, η κίρρωση του ήπατος και το σύνδρομο Reye.

Υπάρχουν τέσσερις κύριοι τύποι αφλατοξινών, Αφλατοξίνη Β<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), Αφλατοξίνη Β<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), Αφλατοξίνη G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), Αφλατοξίνη G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) οι οποίοι και έχουν και τη μεγαλύτερη σημασία για τον πρωτογενή τομέα. Η Αφλατοξίνη Μ<sub>1</sub> είναι ο κύριος ζωικός μεταβολίτης της AFB<sub>1</sub> και ανιχνεύεται στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα που λαμβάνονται από ζώα που έχουν καταναλώσει ζωοτροφές μολυσμένες με AFB<sub>1</sub>. Αναφορικά με την εντόπισή της στο γάλα, οι περισσότερες μελέτες και έρευνες αφορούν στο παστεριωμένο γάλα και πολύ λιγότερο στο νωπό, επειδή το πρώτο συγκεντρώνει και το μεγαλύτερο ενδιαφέρον των καταναλωτών (Κουρουσέκος, 2008). Στην Εικόνα 1 παρουσιάζονται οι χημικοί τύποι των αφλατοξινών.

**Εικόνα 1:** Χημικοί τύποι Αφλατοξινών



Το γένος *Aspergillus* έχει περιγραφεί εδώ και 300 χρόνια και περιλαμβάνει περίπου 100 αναγνωρισμένα είδη. Οι αφλατοξίνες συντίθενται από τέσσερα είδη του γένους: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* και *A. tamarii*. Μόνο τα είδη, *flavus* & *parasiticus* εμπλέκονται στον πρωτογενή αγροτικό τομέα, με τον *A. flavus* να κυριαρχεί στις μολυσμένες περιοχές (Payne and Brown, 1998). Και οι δύο είναι ικανοί να δραστηριοποιηθούν σε ζώντα φυτά, πριν από τη συγκομιδή τους (Piener et al., 1987). Η οικολογία τους είναι πολύ πιο πολύπλοκη από αυτή των μετασυσπλεκτικών μυκήτων αλλοίωσης. Φαίνεται ότι ο *A. parasiticus* είναι καλά προσαρμοσμένος στο περιβάλλον του εδάφους, και είναι χαρακτηριστική η εμφάνισή του σε συγκεκριμένα εμπορεύματα, όπως είναι τα αράπικα φιστίκια, λόγω της λιπόφιλης φύσης του, την ίδια στιγμή που ο *A. flavus* προσαρμόζεται και εμφανίζει έντονη δραστηριότητα σε καλά αεριζόμενα μέρη των φυτών, όπως τα φύλλα και τα άνθη και γι' αυτό τον λόγο κυριαρχεί στο καλαμπόκι και τον βαμβακόσπορο. Η ικανότητα του δεύτερου να παράγει ένζυμα όπως η πεκτινάση και η κουτινάση, του επιτρέπει να διεισδύει και σε μη κατεστραμμένους καρπούς, παρότι σε γενικές γραμμές ο μύκητας αυτός δημιουργεί αποικίες σε κατεστραμμένους πυρήνες.

Οι *A. flavus* και *A. parasiticus* εμφανίζουν ευρεία διασπορά στο περιβάλλον με μεγαλύτερη προτίμηση στους ελαιώδεις καρπούς, αλλά και σε καρπούς μετά το στάδιο της συγκομιδής τους, εφόσον δεν έχουν υποστεί αφυδάτωση. Αναπτύσσονται κυρίως σε τροπικά ή υποτροπικά κλίματα, καθώς η θερμοκρασία ανάπτυξής τους κυμαίνεται ανάμεσα στους 12-48°C, με βέλτιστη τους 36-38°C. Επιβιώνουν στο έδαφος και τα υπολείμματα καρπών και όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές παράγουν σπόρια που διασπείρονται με τον άνεμο. Ο *A. flavus* ευθύνεται για την παραγωγή μόνο των AFB1 και AFB2, με ένα μόνο ποσοστό των στελεχών του να είναι τοξικό. Αντίστοιχα, ο *A. parasiticus* παράγει τις αφλατοξίνες B1, B2, G1 και G2, με σχεδόν όλα τα στελέχη του να είναι τοξικά.

Χαρακτηριστική ιδιότητα των αφλατοξινών είναι ο έντονος φθορισμός των διαλυμάτων τους υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας ( $\lambda_{max}=365nm$ ). Έτσι, οι B1 και B2 έλαβαν το όνομά τους από το χρώμα του φθορισμού που δίνουν (μπλε-blue), ενώ οι G1 και G2 από το αντίστοιχο πράσινο-green χρώμα, κατά τον διαχωρισμό τους στις πλάκες της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Οι αφλατοξίνες M1 και M2 αποτελούν τις υδροξυλιωμένες μορφές των B1 και B2 αντίστοιχα, και δεν παράγονται άμεσα από τους ασπέργιλλους, αλλά προκύπτουν

μέσω του μεταβολισμού των δευτέρων στα πεπτικά συστήματα των ανθρώπων και των ζώων που καταναλώνουν μολυσμένες ζωοτροφές (Troller, 1993).

Η AFB<sub>1</sub> θεωρείται η πιο επικίνδυνη καρκινογόνος ουσία που απαντάται στη φύση και γι' αυτό τον λόγο, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) την κατατάσσει στην Ομάδα 1 του IARC (International Agency for Research on Cancer) καρκινογόνοι παράγοντες για τον άνθρωπο (Rosi et al., 2007). Η ίδια υπηρεσία ταξινόμησε την AFM<sub>1</sub> στην κατηγορία 2B: Πιθανά καρκινογόνος ουσία για τον άνθρωπο (Cathey et al., 1994; Moss, 2002; Creppy, 2002). Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η καρκινογόνος δράση της AFB<sub>1</sub> είναι περίπου 1000 φορές ισχυρότερη από αυτή του βενζοπυρενίου, ενός αρωματικού υδρογονάνθρακα που αποτελεί το δραστικότερο μεταλλαξιογόνο συστατικό του καπνού των τσιγάρων (Cole and Cox, 1981). Επίσης, η AFB<sub>1</sub> είναι περίπου τέσσερις φορές πιο τοξική από την AFB<sub>2</sub>. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τα Τρόφιμα (EET), όσον αφορά τις αφλατοξίνες, δήλωσε στη γνώμη της 23<sup>ης</sup> Σεπτεμβρίου 1994, ότι οι αφλατοξίνες είναι γονιδιοτοξικά καρκινογόνα. Λόγω της μεταφοράς τους στα τρόφιμα, και συνεπώς και στον οργανισμό του ανθρώπου, μέσω της τροφικής αλυσίδας, θεωρούνται ότι μπορούν να επηρεάσουν σε μεγαλύτερο βαθμό από όλες τις υπόλοιπες μυκοτοξίνες την ανθρώπινη υγεία.

Οι παράγοντες που επιδρούν στην παραγωγή των αφλατοξινών από τους μύκητες είναι:

- Η Θερμοκρασία. Οι περισσότεροι μύκητες αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος. Υπάρχουν όμως και μύκητες που μπορούν να αναπτυχθούν σε πολύ υψηλές ή σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Η άριστη θερμοκρασία π.χ. για τον *A. flavus* είναι 37° C.

- Η Υγρασία. Συνήθως απαιτείται υψηλή υγρασία, αλλά υπάρχουν διαφορές στις συνθήκες ανάπτυξης των μυκήτων, ακόμη και όταν ανήκουν στο ίδιο γένος (Diekman και Green, 1992). Η ελάχιστη σχετική υγρασία για τη βλάστηση των σπορίων είναι περίπου 80%. Για το λόγο αυτό, ζωοτροφές με υψηλά αρχικά ποσοστά υγρασίας πρέπει πριν τη χρήση τους να υπόκεινται σε ξήρανση.

- Το φως. Γενικά οι μύκητες παράγουν περισσότερες τοξίνες, απουσία φωτός.

- Το διαθέσιμο οξυγόνο. Οι μύκητες δεν μπορούν να αναπτυχθούν χωρίς την παρουσία οξυγόνου σε αναλογία 1-2%, τουλάχιστον.

- Το pH. Το ιδανικό κυμαίνεται από 4-4,6.



- Το υπόστρωμα. Υποστρώματα που ευνοούν την παραγωγή τους είναι τα φυτικής προέλευσης τρόφιμα (καλαμπόκι, βαμβακόσπορος, ξηροί καρποί κ.ά.), σε αντίθεση με τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης που είναι λιγότερο επικίνδυνα. Συμπληρωματικά, πολύ σημαντικό ρόλο παίζει και η ευαισθησία συγκεκριμένων υβριδίων φυτών.

- Η παρουσία χημικών ουσιών. Ουσίες όπως το NaCl, το σορβικό οξύ, η καφεΐνη, κ.ά. εμφανίζουν μυκοστατική δράση και εμποδίζουν επομένως την παραγωγή αφλατοξίνης. Επίσης διάφορα μπαχαρικά, όπως η κανέλλα και το γαρύφαλλο αναφέρεται ότι εμποδίζουν την ανάπτυξη των μυκήτων (Βάσσος, 2004).

- Ο μικροβιακός ανταγωνισμός. Η παραγωγή των αφλατοξινών αναστέλλεται από τη συνύπαρξη οξεογαλακτικών βακτηρίων και ορισμένων μυκήτων. Το φαινόμενο αποδίδεται στον ανταγωνισμό που αναπτύσσεται μεταξύ τους ως προς τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών καθώς και στην παραγωγή μεταβολιτών με αντιαφλατοξιγονική δράση από τους συνυπάρχοντες μικροοργανισμούς (Ruiquian et al., 2005).

Αφλατοξίνες έχουν ανιχνευθεί σε μεγάλο αριθμό αγροτικών προϊόντων και ξηρών καρπών. Παλαιότερα πιστευόταν ότι παράγονται μετά τη συγκομιδή των καρπών, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους. Αποδείχθηκε όμως, ότι οι αφλατοξίνες μπορούν να αναπτυχθούν και στους αγρούς κατά την καλλιέργεια των φυτών (Moss, 1989). Η ανίχνευση των υπεύθυνων μυκήτων δεν υποδηλώνει κατ' ανάγκη και την ύπαρξη αφλατοξίνης, καθώς οι συνθήκες για την παραγωγή της τοξίνης είναι πιο οριακές από αυτές για την ανάπτυξη του μύκητα και συνδέονται με παράγοντες που προκαλούν στρες.

Η ευρεία παρουσία των μυκήτων που τις παράγουν, έχει σαν αποτέλεσμα διάφορα αγροτικά προϊόντα να είναι ευάλωτα στη μόλυνση και οι αφλατοξίνες να είναι παρούσες σε μεγάλο αριθμό τροφίμων. Μέσω του μεταβολισμού αυτών των μυκοτοξινών, η κατανάλωση μολυσμένης ζωοτροφής οδηγεί στην μόλυνση των προϊόντων ζωικής προέλευσης, όπως το κρέας, το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Στα τελευταία ανιχνεύονται οι αφλατοξίνες  $M_1$  και  $M_2$  που αποτελούν μεταβολίτες των αφλατοξινών  $B_1$  και  $B_2$ , και οι οποίες απαντώνται στις ζωοτροφές. Ακολουθώντας την απορρόφηση των ουσιών αυτών, ένα μέρος της  $AFB_1$  μειώνεται στη μεγάλη κοιλία, σαν αποτέλεσμα της μετατροπής του σε αφλατοξικόλη. Το κλάσμα που απομένει απορροφάται από τον εντερικό βλεννογόνο, με παθητική διάχυση και υδροξυλιώνεται στο ήπαρ, προς  $AFM_1$  (Kuilmann et al., 2000). Η  $AFM_1$

συνδέεται με το γλυκορουνικό οξύ και απεκκρίνεται μέσω της χολής, ή εισέρχεται στη συστηματική κυκλοφορία. Η κυκλοφορούσα AFM<sub>1</sub> μπορεί να απεκκριθεί στο ούρο ή να εμφανισθεί στο γάλα.

Η εφαρμοζόμενη γενετική επιλογή για υψηλές αποδόσεις σε γαλακτοπαραγωγή, οδήγησε στην απαραίτητη προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων εύπεπτων συστατικών ζωοτροφών, υψηλής ενεργειακής απόδοσης, στο σιτηρέσιο των μηρυκαστικών. Έτσι, αφλατοξίνες ανιχνεύονται σε πολλά τυπικά σιτηρέσια, πλούσια σε ενέργεια, όπως για παράδειγμα, σε σπόρους δημητριακών, γλουτένη καλαμποκιού, προϊόντα σόγιας, όπως επίσης και σε πίτες από την επεξεργασία ελαιούχων φυτών, όπως τα φιστίκια, οι ηλιάνθοι, ο βαμβακόσπορος, και ο αποξηραμένος καρπός κακάο.

Η εκτατική μορφή εκτροφής είναι συνηθισμένη στη Μεσόγειο (Boyazoglou, 2002) και συνδέεται με τη χρήση των φυσικών πηγών-πόρων της γης, όπου οι αίγες τρέφονται κυρίως με βοσκή. Αυτό μειώνει την έκθεση τους σε αφλατοξίνες (Roussi et al., 2002). Αυτό το στοιχείο υποστηρίζει μία πιο υγιεινή εικόνα των προϊόντων αίγιου γάλακτος που εκτρέφονται σε εκτατικές μονάδες σε περιοχές της Μεσογείου (Debeuf et al., 2004). Αυτός ο παράγοντας μπορεί να προσδώσει αξία στα προϊόντα και στα εθνικά τυπικά τους χαρακτηριστικά (Rubino et al., 1999).

Μία επίσης σημαντική αύξηση των επιπέδων της AFM<sub>1</sub> σε γαλακτοκομικά προϊόντα σημειώθηκε στις Η.Π.Α. το 1988-1989, σαν αποτέλεσμα της χορήγησης μολυσμένης με AFB<sub>1</sub> ζωοτροφής, και πιο συγκεκριμένα καλαμποκιού, γεγονός που αποδόθηκε σε μία σοβαρή ξηρασία-ανομβρία που εκδηλώθηκε στις Μεσοδυτικές Πολιτείες των Η.Π.Α. το 1988, και η οποία δημιούργησε ιδανικές συνθήκες για την παραγωγή αφλατοξίνης από τον *A. flavus*.

### **2.3.1. Ιδιότητες των αφλατοξινών**

Χημικά οι αφλατοξίνες είναι υψηλά οξυγονωμένες, φθορίζουσες ετεροκυκλικές ενώσεις που δεν γίνονται αντιληπτές με την όσφρηση ή τη γεύση, παρουσιάζουν φθορισμό στο υπεριώδες φως και είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές στις υψηλές θερμοκρασίες, καθώς παραμένουν σταθερές σε θερμοκρασίες πάνω από τους 320° C. Οι συνηθισμένες τεχνικές επεξεργασίας των τροφίμων, όπως ο βρασμός, η ζύμωση, η ψύξη, η κατάψυξη και η παστερίωση δε είναι ικανές να τις αδρανοποιήσουν (Izquierdo et al., 2005). Είναι ελαφρώς διαλυτές στο νερό,

αδιάλυτες σε μη πολικούς διαλύτες, και διαλυτές σε μετρίως πολικούς ή σε πολικούς οργανικούς διαλύτες, όπως το χλωροφόρμιο, το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη.

### **2.3.2. Αφλατοξίνη M1**

Η AFM1 αποτελεί την υδροξυλιωμένη μορφή της AFB1 η οποία ανιχνεύεται στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα που λαμβάνονται από ζώα που έχουν καταναλώσει ζωοτροφές μολυσμένες με AFB1 (Rahimi, 2010). Ανιχνεύεται στο γάλα 12-24 ώρες μετά την έναρξη λήψης της AFB1 από το ζώο, με το μέγιστο της συγκέντρωσής της να παρατηρείται εντός τριών ημερών (Applebaum et al., 1982; Jensen, 1995). Από τη στιγμή που διακοπεί η χορήγηση της μολυσμένης τροφής στο ζώο, τα επίπεδα της AFM1 στο γάλα μειώνονται και μηδενίζονται σε διάστημα 6 ημερών. Σε αγελάδες που έλαβαν 13 mg αφλατοξίνης B1 την ημέρα, επί 7 ημέρες, η AFM1 ανιχνεύθηκε στο γάλα μέχρι την 10η ημέρα, ενώ παράλληλα μειώθηκαν η παραγωγή γάλακτος και η πρόσληψη τροφής από τα ζώα (Applebaum et al., 1982). Η σχέση μεταξύ της ποσότητας AFB1 που λαμβάνει ένα ζώο όταν καταναλώνει μολυσμένες ζωοτροφές και της ποσότητας AFM1 που σχηματίζεται στο σκώτι του ζώου, έχει βρεθεί ότι είναι γραμμική (Dregacci et al., 1995). Ο βαθμός μετατροπής της απορροφούμενης AFB1 σε AFM1 είναι γενικά χαμηλός και εμφανίζεται στο γάλα με ένα εύρος μεταξύ 0,5-5% για τα περισσότερα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένων των αρμεγόμενων αγελάδων και των ανθρώπων (Patterson et al., 1980). Ένα ποσοστό 0,3-6,2% της AFB1 που προσλαμβάνουν τα μηρυκαστικά, μετατρέπεται σε AFM1 και πηγαίνει στο γάλα (Creppy, 2002).

Παράγοντες που επηρεάζουν το ποσοστό της AFB1 που μεταφέρεται στο γάλα με τη μορφή της AFM1 είναι:

- Η φάση της γαλακτικής περιόδου, καθώς στην έναρξη της γαλακτοπαραγωγής η μεταφορά είναι 3,3-3,5 φορές εντονότερη από τη φάση της έντονης γαλακτοπαραγωγής.
- Η παρουσία η μη παθολογικών καταστάσεων του μαστού και κυρίως, μαστίτιδων.
- Η αρχική συγκέντρωση της καταναλισκόμενης AFB1 .
- Παράγοντες που σχετίζονται με την περιοχή και την εποχή του έτους, καθώς η μόλυνση του γάλακτος με AFM1 παρουσιάζει έντονη εποχιακή διακύμανση, με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις να παρατηρούνται κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Η παρατήρηση αυτή συνδέεται με το γεγονός ότι, προς το τέλος της θερινής

περιόδου, τα ζώα καταναλώνουν σε μεγαλύτερο βαθμό χονδροειδείς ζωοτροφές σε σχέση με τις συμπυκνωμένες, που καταναλώνουν κυρίως κατά τη διάρκεια του χειμώνα, όταν και το φαινόμενο αυτό αντιστρέφεται, με τις συμπυκνωμένες να περιέχουν υψηλότερα επίπεδα AFB1 (Celik et al., 2005).

- Οι διαφορές μεταξύ των ζώων που σχετίζονται με τον ίδιο τον οργανισμό τους, όπως ο ρυθμός κατανάλωσης, ο ρυθμός πέψης, η φυλή, η υγεία και η ατομικότητα του ζώου. Αυτό σημαίνει ότι το ποσοστό αυτό διαφέρει ακόμη και από ζώο σε ζώο, μέσα στην ίδια αγέλη, από ημέρα σε ημέρα και από άμελξη σε άμελξη (Martins and Martins, 2000).

Ο φραγμός μεταξύ αίματος και γάλακτος περιλαμβάνει διαφορετικές ανατομικές δομές και διαδικασίες ενεργητικής μεταφοράς. Το φυσικό φράγμα διαμορφώνεται με το επιθήλιο των τριχοειδών αγγείων του αίματος, που εκτείνονται στο επιθήλιο εκκρίσεως του μαστικού αδένου. Πολικές ουσίες και μεγάλα μόρια δεν μπορούν να περάσουν αυτό τον φραγμό με παθητική διάχυση. Παράγοντες που επίσης εμπλέκονται στην απέκκριση με το γάλα, είναι το μοριακό βάρος και η λιποφιλικότητα μιας ένωσης, καθώς και ο βαθμός σύνδεσης της ουσίας με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, καθώς μόνο το δεσμευμένο κλάσμα μπορεί να μεταφερθεί. Ο ρυθμός μεταφοράς επηρεάζεται επίσης από τη διαφορά στη τιμή του pH μεταξύ πλάσματος και γάλακτος. Σε ένα υγιές ζώο, το pH του γάλακτος είναι χαμηλότερο από το pH του πλάσματος, ενώ σ' ένα άρρωστο ζώο (μαστίτιδα), το pH του γάλακτος είναι ίσο ή υπερβαίνει το pH του πλάσματος. Οι διαφορές αυτές ρυθμίζουν την ταχύτητα μεταφοράς στο γάλα, όπως καταδείχθηκε και για διάφορα φάρμακα.

Οι μεταβολές στον φραγμό μεταξύ του αίματος και του γάλακτος, μπορούν να οφείλονται σε συστηματικές ή/και τοπικές λοιμώξεις (μαστίτιδες). Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, η πρόσληψη AFB1 από αρμεγόμενες αγελάδες, κάτω από το αποδεκτό όριο, μπορεί να οδηγήσει σε απέκκριση της AFM1 στο γάλα, πάνω από το ανεκτό όριο της ΕΕ (Frobish et al. 1986; Veldman et al. 1992).

Η AFM1 έχει βρεθεί στο γάλα της αγελάδας, της προβατίνας, της αίγας, της βουβάλας, της καμήλας, αλλά και της γουναίκας (Galvano και συν. 1996). Μάλιστα στην τελευταία, έχει ανιχνευθεί σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις, κυρίως σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές (El-Nezami et al., 1995; Saad et al., 1995; Galvano et al., 1996, Abdulrazzaq et al., 2003).

Εστιάζοντας στο γάλα αγελάδος, η αναλογία της προσλαμβανόμενης με την τροφή AFB1, προς την απεκκρινόμενη με το γάλα AFM1, φαίνεται να κυμαίνεται

από 58:1 έως 75:1 (κ.μ.ό. 66:1). Η αναλογία αυτή ποικίλει από ζώο σε ζώο και από ημέρα σε ημέρα, αλλά και μεταξύ των αμέλξεων και εξαρτάται, και από την ημερήσια παραγωγή γάλακτος (Harris and Staples, 1992).

Σε ότι αφορά τα πρόβατα, φαίνεται ότι, το ποσοστό της AFB<sub>1</sub> που απεκκρίνεται στο γάλα ως AFM<sub>1</sub>, είναι μικρότερο συγκριτικά με τα βοοειδή και τις αίγες (Battacone et al., 2003). Εικάζεται ότι η αντίστασή τους αυτή έχει να κάνει με τον σχετικά πολύ περισσότερο αποτελεσματικό, αποτοξινωτικό σύστημα που διαθέτουν, το οποίο περιλαμβάνει την διάσπαση των αφλατοξινών σε μικρότερους μη τοξικούς και μη φθορίζοντες μεταβολίτες. Από την άλλη μεριά, η ποσότητα της AFM<sub>1</sub> που απεκκρίνεται στο αίγιο γάλα, κυμαίνεται μεταξύ 0,18% και 3% της ποσότητας της AFB<sub>1</sub> που απορροφήθηκε (Stoloff, 1980; Goto and Hsieh, 1985). Αυτή η μεταφερόμενη AFM<sub>1</sub> μπορεί επίσης να ανιχνευθεί σε γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως τυρί, γιαούρτι και βούτυρο (Govaris et al., 2001; Martins and Martins, 2004). Εξαρχής διάφορες μελέτες υποστήριξαν ότι το πρόβατο είναι το περισσότερο ανθεκτικό είδος ζώου στις μυκοτοξινώσεις (Miller and Wilson, 1994). Παρόλα αυτά βρέθηκε ότι, δίαιτες μολυσμένες με αφλατοξίνες (79% AFB<sub>1</sub>, 16% AFG<sub>1</sub>, 4% AFB<sub>2</sub> και 1% AFG<sub>2</sub>) και δόθηκαν σε αρνιά σε αναλογία 2,5 mg/kg ή 5,0 mg/kg ζωοτροφής για 35 ημέρες, οδήγησαν σε ηπατοξικότητα (Harvey et al., 1995). Σε άλλη μελέτη, (Fernandez et al., 1997), αρνιά που ταΐστηκαν με αφλατοξίνες σε δόση 2,5 mg/kg ζωοτροφής καθημερινά για 21 ημέρες, ανέπτυξαν συμπτώματα κλινικής αφλατοξίκωσης, με ηπατικές και νεφρικές αλλοιώσεις. Η μεταφορά στις αίγες και τις αγελάδες είναι συγκρίσιμη με την τελευταία να κυμαίνεται μεταξύ 0,35 και 3%, φθάνοντας στο 6,2% σε άτομα με υψηλή παραγωγικότητα (Frobisch et al., 1986, Veldman et al., 1992).

### **2.3.3. Παρουσία της αφλατοξίνης M<sub>1</sub> στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα**

Οι Roussi et al., (2002) ανέφεραν ότι η συχνότητα εμφάνισης μόλυνσης με AFM<sub>1</sub> σε νωπά δείγματα πρόβειου γάλακτος, που ελήφθησαν από διαφορετικούς παραγωγούς γάλακτος κατά μήκος της Ελλάδας), ήταν 66,7% το 2000, και 73,3% το 2001, με μόνο ένα δείγμα να ξεπερνά το όριο που θέσπισε η Ε.Ε. Γενικά εκτιμήσεις σχετικά με την μόλυνση του νωπού πρόβειου γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων, αναφέρουν συγκεντρώσεις AFM<sub>1</sub> χαμηλότερες από το ανεκτό επίπεδο των 25ng/kg (Finoli and Vecchio, 2003; Kaniou-Grigoriadou et al., 2005). Σε σχετική

έρευνα της Κλινικής Παραγωγικών Ζώων της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα νωπού γάλακτος από μεμονωμένα ζώα 10 μονάδων αγελάδων γαλακτοπαραγωγής, η AFM<sub>1</sub> ανιχνεύθηκε στο 70,1% των δειγμάτων. Το ποσοστό όμως των δειγμάτων, που εμφάνιζε συγκεντρώσεις AFM<sub>1</sub> υψηλότερες από το ανώτατο επιτρεπτό όριο, ανήλθε στο 22,1%. Γενικά, ενώ για τις γαλακτοφόρες αγελάδες υπάρχει αρκετή βιβλιογραφία διαθέσιμη, στην περίπτωση των προβάτων που αρμέγονται, υφίσταται πολύ μικρή πληροφόρηση, σχετικά με την μεταφορά της AFM<sub>1</sub> στο γάλα.

Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσης, η AFM<sub>1</sub> που περιέχεται στο γάλα παραμένει γενικά σταθερή και ομογενοποιημένη, παρότι ορισμένοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι, σε κάποιες περιπτώσεις, η περιεκτικότητά της εμφανίζει σημαντική διακύμανση και ανομοιογένεια. Γενικά οι αφλατοξίνες και οι μεταβολίτες τους επιδεικνύουν μία αξιοσημείωτη σταθερότητα κατά την επεξεργασία του γάλακτος. Οι Harris και Staples (1992) παρατήρησαν ότι, η συγκέντρωση της AFM<sub>1</sub> στο παστεριωμένο γάλα παρέμεινε η ίδια με αυτή του νωπού γάλακτος μετά από 17 μέρες στους 39° F (3,89° C). Στην παστερίωση θεωρείται ανθεκτικός και ο έτερος μεταβολίτης της AFB<sub>1</sub>, η αφλατοξικόλη (Carvajal et al., 2003β). Παρόλα αυτά, οι Purchase et al., (1972) ανακάλυψαν ότι η παστερίωση του γάλακτος στους 62° C για 30 min, μειώνει τα ποσοστά της AFM<sub>1</sub> κατά 32%. Ένα χρόνο αργότερα ο Mc Kinney και οι συνεργάτες του (1973) παρατήρησαν ότι μετά από 4 ημέρες συντήρησης του γάλακτος στους 0° C, το 40% της τοξίνης αδρανοποιείται, ενώ μετά από 6 ημέρες αδρανοποιείται περίπου το 80%. Επίσης, σε μελέτη των (Καπίου-Grigoriadou et al., 2005) αναφέρεται μείωση της AFM<sub>1</sub> κατά 34% μετά από πάροδο 2 εβδομάδων στους 21° C.

Η συμπύκνωση (εβαπορέ) και η αφυδάτωση του γάλακτος, που είναι αποτέλεσμα μερικής ή ολικής απομάκρυνσης του ύδατος, συμβάλλει στην συμπύκνωση των στερεών συστατικών του γάλακτος και μαζί με αυτά και της AFM<sub>1</sub>, καθιστώντας την πιο επιρρεπή στο O<sub>2</sub>, το φως ή σε άλλους αποσταθεροποιητικούς παράγοντες.

Ο διαχωρισμός της κρέμας μπορεί να επηρεάσει την κατανομή της AFM<sub>1</sub>, καθώς σε ένα ποσοστό 80% περιέχεται στο τμήμα του ορού, ενώ σε ένα ποσοστό 30% συνδέεται με μη λιπαρά συστατικά και ειδικότερα με την καζεΐνη (Grant and Carlson, 1971). Άλλοι ερευνητές υπολογίζουν τον διαχωρισμό της AFM<sub>1</sub> κατά την αποβουτύρωση, σε ποσοστό 10% στο κλάσμα του λίπους και σε ποσοστό 90% στο

αποβουτυρωμένο γάλα (Guerre et al., 2000). Η συμπεριφορά αυτή της AFM<sub>1</sub> στην επεξεργασία που περιλαμβάνει τον διαχωρισμό του λίπους του γάλακτος, μπορεί να εξηγηθεί από τον ημιπολικό της χαρακτήρα. Είναι ένα υδατοδιαλυτό συστατικό που συνδέεται με τις υδροφοβικές πλευρές των καζεϊνών (Kaniou-Grigoriadou et al., 2005), γεγονός που οδηγεί στην ποσοτική επικράτηση της στο μη λιπαρό κλάσμα του γάλακτος (Van Egmond & Panlsch, 1986). Μέσω αυτής της απορρόφησης της από τα μόρια της καζεΐνης, μπορεί να βρεθεί στα διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα (Montagna et al., 2008).

Επακόλουθο της παρουσίας AFM<sub>1</sub> στο γάλα είναι και η λήψη της από τα ζώα που θηλάζουν. AFM<sub>1</sub> έχει βρεθεί και στο πρωτόγαλα όπου και διαπιστώθηκε ότι συνδέεται με τις ανοσοσφαιρίνες (Hafez et al., 1985). Σε ότι αφορά την επίδρασή τους στην υγεία του μαστού, δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι η παρουσία τους εκεί μπορεί να οδηγήσει σε φλεγμονή. Σε μία έρευνα, όταν χορηγήθηκε αφλατοξίνη σε αγελάδες, με μαστούς μολυσμένους με σταφυλόκοκκο και στρεπτόκοκκο, παρατηρήθηκε μείωση της γαλακτοπαραγωγής και αύξηση του μικροβιακού φορτίου στο γάλα, αλλά δεν εκδηλώθηκαν κλινικές μαστίτιδες (Brown et al., 1981).

Κατά την τυροκόμηση του γάλακτος προκύπτουν δύο φάσεις, το τυρόπηγμα και το τυρόγαλα. Το τυρόπηγμα αποτελεί περίπου το 10-25% του αρχικού βάρους του γάλακτος και το υπόλοιπο 75-90% είναι το τυρόγαλα. Όταν το τυρί παρασκευάζεται από γάλα που περιέχει την AFM<sub>1</sub>, αυτή μεταφέρεται τόσο στον ορό του γάλακτος, όσο και στο τυρόπηγμα. Η κατανομή της AFM<sub>1</sub> μεταξύ τυροπήγματος και τυρογάλακτος παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση. Οι διαφορές αυτές στην κατανομή, μπορεί να οφείλονται στην τεχνική/μέθοδο που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αφλατοξίνης, στο είδος του γάλακτος, τον διαφορετικό τρόπο έκφρασης των αποτελεσμάτων, στην διαφορετική τεχνική παρασκευής του τυριού και τέλος, στην παρουσία μικρής ποσότητας τυροπήγματος στον ορό (Blanco et al., 1980; Galvano et al., 1996). Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι η AFM<sub>1</sub> είναι σταθερή κατά τη διαδικασία της τυροκόμησης και ότι το 40-57% της συνολικής αφλατοξίνης βρίσκεται στο τυρόπηγμα (Stubblefield and Shannon, 1975; Stubblefield et al., 1980). Λαμβάνοντας όμως υπόψη το συντελεστή κατανομής της AFM<sub>1</sub> στο νερό, θα περίμενε κανείς ότι η μεγαλύτερη ποσότητα της αφλατοξίνης θα έπρεπε να βρίσκεται στον ορό του γάλακτος. Αυτή η μεγαλύτερη του αναμενομένου αναλογία της τοξίνης που καταλήγει στο τυρόπηγμα, πιθανά αποδίδεται στο γεγονός ότι η αφλατοξίνη δεσμεύεται στην καζεΐνη του γάλακτος (Brackett and Marth, 1982). Μία

δεύτερη αιτία αυτού του γεγονότος μπορεί να είναι ότι ένα μέρος του ορού του γάλακτος παραμένει στο τυρόπηγμα. Επεξεργασίες όπως η υπερδιήθηση δεν απομακρύνουν σημαντικό μέρος της AFM<sub>1</sub>, καθώς το 80% της αρχικής ποσότητας παραμένει στο τυρόπηγμα (Barbiroli et al., 2007). Σε αντίθεση με τα παραπάνω, οι Purchase et al., (1972) ανέφεραν ότι το Cottage cheese που παρασκευάστηκε με όξινη πήξη φυσικά μολυσμένου γάλακτος, δεν περιείχε καθόλου AFM<sub>1</sub>, η οποία ήταν παρούσα στον ορό. Τέλος, οι Govaris και συν. (2001) βρήκαν ότι στο τυρί τελεμές, η συγκέντρωση της AFM<sub>1</sub> ήταν υψηλότερη στην αρχή, παρά στο τέλος της περιόδου παραγωγής του. Γενικά πιστεύεται ότι η συγκέντρωση της AFM<sub>1</sub> στο τυρί ποικίλει και εξαρτάται από τον τύπο του τυριού, το περιεχόμενο νερό και την τεχνολογία παραγωγής του (Bakirci, 2001; Lopez et al., 2001).

Κατά την τυροκόμηση ουσιαστικά επέρχεται μία συμύκνωση των πρωτεϊνών και συνεπώς και της AFM<sub>1</sub>. Ο βαθμός συμύκνωσης-παράγοντας εμπλουτισμού της AFM<sub>1</sub> στο τυρί έχει υπολογιστεί ότι είναι 2,5-3,3 για τα μαλακά τυριά και 3,9-5,8 για τα σκληρά τυριά (Yousef and Marth, 1989) και μεταξύ 4,3-5,6 σε τυριά από πρόβειο και αίγιο γάλα (Kaniou-Grigoriadou et al., 2005). Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι στο τυρόπηγμα περιέχεται μεγαλύτερη συγκέντρωση AFM<sub>1</sub> σε σχέση με το τυρόγαλα. Στα τυριά τυρογάλακτος, η κατάσταση είναι διαφορετική, καθώς φαίνεται ότι η διεργασία της θέρμανσης με ταυτόχρονη οξίνιση που εφαρμόζεται κατά την παρασκευή τους, εμποδίζει τη δέσμευση της AFM<sub>1</sub> στις (μετουσιωμένες) πρωτεΐνες του ορού (Barbiroli et al., 2007). Τέλος, κατά το στάδιο της ωρίμανσης πολλών τυριών, παρότι έχουν παρατηρηθεί κάποιες μεταβολές στα επίπεδα της AFM<sub>1</sub>, ο γενικός κανόνας είναι ότι δεν διασπάται και δεν μειώνεται σημαντικά (Kiermeier and Mashaley, 1977; Barbieri et al., 1994; Blanco et al., 1988; Prandini et al., 2008). Αντίθετα, η μείωση της υγρασίας προκαλεί περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσής της και ο συνδυασμός τα πρωτεολυτικής και λιπολυτικής διεργασίας, αυξάνει την ανάκτησή της (Brackett and Marth, 1982; Van Egmond, 1983). Η πρωτεόλυση μπορεί να επηρεάσει υδροφοβικές περιοχές καζεϊνών που συνδέονται με τα αντίστοιχα μόρια, απελευθερώνοντας AFM<sub>1</sub>. Σαν αποτέλεσμα όλων των παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η τελική συγκέντρωση της AFM<sub>1</sub> στο τυρί, είναι κατά μέσον όρο, 3,5-5 φορές υψηλότερη από τα αντίστοιχα επίπεδα του γάλακτος (Stoloff, 1980).

Στα τυριά, η παρουσία της AFM<sub>1</sub> αποδίδεται σε τρεις κύριους μηχανισμούς:



A) στην «έμμεση μόλυνση», δηλ. στην παρασκευή τυριού χρησιμοποιώντας μολυσμένο γάλα, από ζώα που κατανάλωσαν ζωοτροφές μολυσμένες με AFM<sub>1</sub>.

B) στην «άμεση μόλυνση», δηλ. στη σύνθεση μυκοτοξινών από μύκητες, οι οποίοι επιμολύνουν το τυρί και αναπτύσσονται σε αυτό, όπως είδη του γένους *Penicillium* και *Aspergillus*. Οι χώροι που ωριμάζουν τα τυριά (ωριμαντήρια) έχουν μεγάλη σχετική υγρασία, που σε πολλές περιπτώσεις φθάνει το 90-95% και επομένως μπορεί να είναι χώροι ευνοϊκοί για την ανάπτυξη μυκήτων. Οι μύκητες που αναπτύσσονται στο τυρί, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης υπό ψύξη, ανήκουν σχεδόν πάντοτε στο γένος *Penicillium*, οι οποίοι σε αντίθεση με τους μύκητες του γένους *Aspergillus*, μπορούν να αναπτυχθούν σε χαμηλές θερμοκρασίες (Bullerman, 1981). Παρόλα αυτά, δεν είναι όλοι οι μύκητες *Penicillium* spp. που απομονώνονται από το τυρί, τοξινογόνοι. Οι μύκητες που παράγουν μυκοτοξίνες απαιτούν οξυγόνο, και ως εκ τούτου, η κατάλληλη συσκευασία του τυριού είναι σημαντική. Οι μύκητες είναι πολύ απίθανο να αναπτυχθούν σε συσκευασία υπό κενό ή σε τυρί επικαλυμμένο με κερί. Η καλή απολύμανση των εργοστασίων κατά τη διάρκεια της βιομηχανικής παραγωγής και των χειρισμών, είναι επίσης σημαντική για την ελαχιστοποίηση ή την πρόληψη της ανάπτυξης μούχλας σε τυρί (Bullerman, 1977). Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι η ανάπτυξη των τοξικών μυκήτων στα τυριά είναι σπάνια, ακόμη και για τυριά που ωριμάζουν με μύκητες (Scott, 1989).

Γ) στην παραγωγή αφλατοξινών από μύκητες που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο παρασκευής και ωρίμανσης των εν λόγω τυριών (Fox et al, 2004).

Τέλος, άλλες μελέτες έδειξαν ότι υπάρχει μία σημαντική μείωση της περιεκτικότητας σε AFM<sub>1</sub> σε ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το κεφίρ και το γιαούρτι.

Οι Kaniou-Grigoriadou et al., το 2005 πραγματοποίησαν έλεγχο για την παρουσία AFM<sub>1</sub> σε 54 δείγματα τυριού φέτας που παρασκευάστηκε με τον παραδοσιακό τρόπο σε τυροκομεία της περιοχής Θεσσαλονίκης. Μετά την πάροδο δύο μηνών ωρίμανσης της φέτας, κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, δεν ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη σε όλα τα δείγματα τυριών που εξετάστηκαν.

Επίσης οι Viridis et al. (2008) μελέτησαν τη συγκέντρωση της AFM<sub>1</sub> σε 41 δείγματα ώριμου σκληρού αίγειου τυριού από 12 εργοστάσια της Σαρδηνίας, στην Ιταλία. AFM<sub>1</sub> ανιχνεύτηκε σε 4 από τα 41 δείγματα, δηλ. σε ποσοστό 9,8%, ενώ η συγκέντρωσή της κυμάνθηκε από 79,5 ng/kg έως 389 ng/kg. Το γενικό συμπέρασμα της έρευνας αυτής είναι ότι στα τυριά που παρασκευάστηκαν με γάλα ζώων

εκτατικής εκτροφής, δεν ανιχνεύθηκε AFM1. Θετικά δείγματα εμφανίστηκαν μόνο σε αυτά που παρασκευάστηκαν από γάλα ζώων εντατικής εκτροφής.

Η παρουσία της AFM1 σε εμπορικά πρόβεια τυριά έχει πρόσφατα αναφερθεί από τους Mikerivini et al., (2000), σε τιμές που κυμαίνονται μεταξύ 0,050 και 0,210 μg/kg, δηλ. αρκετά υψηλότερες σε σχέση με τα όρια της Ε.Ε. για το γάλα.

Άλλες αφλατοξίνες που εντοπίστηκαν, αλλά ακόμη δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς οι επιπτώσεις από την παρουσία ή την κατανάλωσή τους, είναι οι M<sub>2</sub>, B<sub>2a</sub>, Q<sub>1</sub>, η Αφλατοξικόλη (aflatoxicol), οι H, D, G και παρασιτικόλη (parasiticol) (Diekman and Green, 1992).

#### **2.4. Τοξικότητα των αφλατοξινών**

Τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της αφλατοξίκωσης αναφέρονται στη βιβλιογραφία πριν από τον ερχομό του 20<sup>ου</sup> αιώνα (Dalrymple, 1893; Mayo, 1891). Ο Mayo (1891) πρότεινε ότι η τοξίκωση αυτή ήταν μία ασθένεια μοναδική για τα άλογα, καθώς άλλα είδη αγροτικών ζώων δεν έδειχναν να επηρεάζονται. Το σύνδρομο αυτό, με τα χαρακτηριστικά συμπτώματα έγινε γνωστό ως «δηλητηρίαση από μολυσμένο καλαμπόκι» (Schwarte, 1928).

Οι επίδραση των αφλατοξινών στην υγεία των ζώων εξαρτάται από το είδος του ζώου, την ηλικία, το φύλο, τη θρεπτική κατάσταση, τη δόση, τη συχνότητα χορήγησης και τη σύσταση του σιτηρεσίου (Diekman et Green, 1992; Hui et al., 2001). Η καθημερινή ή περιστασιακή κατανάλωση τροφής, που περιέχει αφλατοξίνες, μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της πρόσληψής της, μείωση της παραγωγής, πτώση της ανοσίας έναντι των μικροβίων και των παρασίτων, καθώς και σε εκδήλωση συμπτωμάτων, όπως οι αιμορραγίες στους μυς ή/και στις σωματικές κοιλότητες (Jacobsen et al., 1993). Όλες οι αφλατοξίνες θεωρούνται ότι είναι καρκινογόνες για τα ζώα και τους ανθρώπους (Diekman and Green, 1992). Σε αρκετά υψηλά επίπεδα έκθεσης, οι αφλατοξίνες μπορούν να προκαλέσουν οξεία τοξικότητα, και ενδεχομένως το θάνατο, σε θηλαστικά, πτηνά και ψάρια, καθώς και σε ανθρώπους. Το ήπαρ είναι το κύριο όργανο που επηρεάζεται, αλλά πέρα από αυτό υψηλά επίπεδα αφλατοξίνης έχουν βρεθεί στους πνεύμονες, νεφρούς, εγκέφαλο και καρδιά ατόμων που πέθαναν από οξεία αφλατοξίκωση. Η οξεία νέκρωση και κίρρωση του ήπατος είναι τα τυπικά παθολογοανατομικά ευρήματα, μαζί με αιμορραγία και οίδημα. Η

τιμή του LD50 (θανατηφόρος δόση) για τα ζώα, κυμαίνεται μεταξύ 0,5-10 mg/kg σωματικού βάρους.

Ένας από τους κυριότερους μεταβολίτες της AFB<sub>1</sub> είναι ένα αρκετά ενεργό ηλεκτροφιλικό εποξειδίο, το οποίο, σχηματίζει ομοιοπολικά σύμπλοκα με το DNA, το RNA και τις πρωτεΐνες. Πιο συγκεκριμένα, η αφλατοξίνη αυτή, συνδέεται με τη γουανίνη του DNA, διακόπτοντας την εντολή για τον σχηματισμό του αγγελιαφόρου RNA (mRNA), διαδικασία που σχετίζεται άμεσα με τη διεργασία της μεταγραφής. Αυτή ακριβώς η διακοπή της πρωτεϊνοσύνθεσης προκαλεί αλυσιδωτές διαταραχές στις δομικές πρωτεΐνες και τα ένζυμα, τα οποία είναι απαραίτητα για τον ενεργειακό μεταβολισμό και το μεταβολισμό του λίπους. Από εκεί και πέρα, η μείωση των ενζύμων συμβάλλει σε έναν μειωμένο σχηματισμό δομικών πρωτεϊνών, ακατάλληλο σχηματισμό αντισωμάτων, μειωμένη πέψη του λίπους, νέκρωση και μη ολοκληρωμένη σύνθεση θρομβοποιητικών παραγόντων (Osweiler, 1996).

Γενικά, τα βοοειδή, τα πρόβατα και τα άλλα μηρυκαστικά είναι λιγότερο ευπαθή σε σχέση με τα μονογαστρικά ζώα και τα πτηνά, με τα νεαρά ζώα όλων των ειδών να είναι ευπαθέστερα σε σχέση με τα ενήλικα. Επίσης, οι τροφιμογενείς ελλείψεις σε πρωτεΐνη, σελήνιο και βιταμίνη E, αυξάνουν την ευπάθεια σε αφλατοξίνες (Osweiler, 1996), ενώ πολλές άλλες ουσίες, όπως η γκοσυπόλη και η 3-μεθυλοκουμαρίνη, εμφανίζουν συνεργική δράση με αυτές ως προς την καρκινογένεση (Weidenborner, 2001).

Οι αφλατοξίνες δεν φαίνεται να επηρεάζονται σημαντικά από την μεταβολική επίδραση της μικροβιακής χλωρίδας της μεγάλης κοιλίας των μηρυκαστικών. Κατά τη διάρκεια ενός *in vitro* πειραματισμού, η AFB<sub>1</sub> και άλλες 5 μυκοτοξίνες (Ζεαραλενόνη, Ωχρατοξίνη A, Δεοξυνιβαλενόλη, T2 τοξίνη και Διακετοξυσκιρπενόλη), αναμίχθηκαν με υγρό που περιείχε πρωτόζωα και βακτήρια από τη μεγάλη κοιλία βοοειδών ή προβάτων. Η AFB<sub>1</sub> και η δεοξυνιβαλενόλη παρέμειναν αναλλοίωτες, ενώ αντίθετα, οι υπόλοιπες 4 μυκοτοξίνες μετατράπηκαν, είτε σε τοξικούς είτε σε μη τοξικούς μεταβολίτες (Kießling et al., 1984; Fink-Gremmels 2008).

Αναφορικά με την τοξικότητά τους, η AFM<sub>1</sub> έχει άμεση τοξική δράση, χωρίς να απαιτείται ο μεταβολισμός της σε άλλες τοξικές ενώσεις, σε αντίθεση με την πρόδρομη της B<sub>1</sub> (Neal και συν. 1998). Μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA, μεταλλάξεις γονιδίων, χρωματοσωμικές ανωμαλίες και κυτταρικό μετασχηματισμό σε κύτταρα θηλαστικών *in vitro*, σε έντομα, κατώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα και

βακτήρια. Άλλοι γνωστοί τοξικοί μεταβολίτες της B<sub>1</sub> είναι η αφλατοξίνη Q<sub>1</sub> και η αφλατοξικόλη. Φαίνεται ότι και αυτοί οι μεταβολίτες απεκκρίνονται με το γάλα, αλλά σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις, συγκριτικά με την AFM<sub>1</sub> (Helferich et al., 1986). Η αφλατοξικόλη, με τη σειρά της, πέρα από τη συνήθη τοξική της δράση, βρέθηκε ότι δεσμεύει σε πολύ μικρό ποσοστό τους υποδοχείς οιστρογόνων στη μήτρα (Blankenship et al., 1982). Πιο συγκεκριμένα, στα ζώα, η πρόσληψη αφλατοξίνης σε χαμηλά επίπεδα (περίπου 1ppm) μπορεί να προκαλέσει ανάρθρωση του ρυθμού ανάπτυξης, ανοσοκαταστολή, σοβαρές βλάβες στο ήπαρ και αιμορραγία. Από την άλλη μεριά, η λήψη υψηλών επιπέδων αφλατοξινών, προκαλεί οξεία απώλεια της όρεξης, κατάπτωση, αιμορραγία, διάρροια, ίκτερο και θάνατο (Osweiler, 2005).

Συμπερασματικά, η AFB<sub>1</sub> είναι η περισσότερο δραστική ηπατοτοξίνη και εκδηλώνει μία ποικιλία από βιολογικές δράσεις, όπως η καρκινογενετικότητα, η τερατογόνος δράση και η μεταλλαξιογόνος ικανότητα σε διάφορα αγροτικά ζώα (Applebaum et al., 1982). Η AFM<sub>1</sub> έχει υψηλή γενοτοξική δράση, παρόλο που είναι περίπου 10 φορές λιγότερο καρκινογόνος από την AFB<sub>1</sub> (Lafont et al., 1989). Από τοξικολογικές μελέτες σε ενήλικες πάπιες έχουν προκύψει διάφορες τιμές LD<sub>50</sub> όσον αφορά την τοξικότητα, καρκινογένεση και μεταλλαξιογένεση των τεσσάρων κύριων αφλατοξινών, των οποίων η σειρά είναι: B<sub>1</sub>>G<sub>1</sub>>B<sub>2</sub>>G<sub>2</sub>. Γενικά, ο τρόπος δράσης των αφλατοξινών είναι περίπλοκος, ακριβώς επειδή τα φυσικά προϊόντα μεταβολίζονται με πολλούς διαφορετικούς τρόπους στο ήπαρ των διαφόρων ειδών.

## 2.5. Επίπτωση στην υγεία του ανθρώπου

Όπως στα ζώα, έτσι και στον άνθρωπο, οι επιπτώσεις της λήψης αφλατοξινών μέσω της κατανάλωσης τροφίμων, συνδέονται άμεσα με τη δόσολογία και το συνολικό χρόνο της έκθεσης (όπως άλλωστε ισχύει για όλες τις χημικές τοξίνες). Έτσι διακρίνουμε 2 κλινικές μορφές: α) την οξεία αφλατοξίκωση, η οποία εκδηλώνεται με τη μορφή επεισοδίων δηλητηρίασης και χαρακτηρίζεται από έντονη ηπατοτοξικότητα, ίκτερο με εκτεταμένη καταστροφή του ηπατικού παρεγχύματος, κατάπτωση, ανορεξία, έμετο, κοιλιακό άλγος και μία θνησιμότητα που αγγίζει το 25%. β) την χρόνια αφλατοξίκωση, που χαρακτηρίζεται από την εκδήλωση μεταλλάξεων και τερατογενέσεων, την ανοσοκαταστολή, την κακή θρεπτική κατάσταση, καθώς και από την πρόκληση του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (Diekman and Green, 1992), του οποίου η παθογένεση φαίνεται να συσχετίζεται με

την ταυτόχρονη παρουσία της ηπατίτιδας Β και άλλων παραγόντων κινδύνου, όπως η αλκοολική κίρρωση (WHO & U.S. C.D.C., 2005). Η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του ήπατος στους ανθρώπους είναι υψηλή μόνο σε περιοχές όπου επικρατούν τόσο οι αφλατοξίνες, όσο και ο HBV (Roberts et al., 1996). Η αφλατοξίνη ίσως μεταβάλλει την παθογένεια του ιού της ηπατίτιδας, επηρεάζοντας ίσως την ευαισθησία σε μόλυνση ή την αντιγραφή του ιού.

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα είναι μία παγκόσμια διαδεδομένη κακοήθεια με την 4<sup>η</sup> υψηλότερη θνησιμότητα παγκοσμίως. Έχει υπολογισθεί ότι προκαλεί περίπου 500.000 θανάτους ετησίως. Γεωγραφικές περιοχές με συγκεκριμένο ενδιαφέρον είναι η Ασία, η Νότια Κίνα και η υποσαχάρια Αφρική. Αυξημένη όμως επίπτωση έχει πρόσφατα παρατηρηθεί και στις Η.Π.Α.. Οι όγκοι σε άλλα σημεία (π.χ. τα νεφρά) έχουν παρατηρηθεί, αλλά είναι πολύ λιγότερο συχνοί.

Τα παιδιά, απ' την άλλη μεριά, επηρεάζονται ιδιαίτερα από την αφλατοξίνη, που τα οδηγεί σε καθυστέρηση στην ανάπτυξη και σε νοητική στέρηση. Οι αφλατοξίνες επίσης είναι σε θέση να διασχίζουν τον πλακούντα και να βιοενεργοποιούνται στη μήτρα, όπως αποκαλύφθηκε από την παρουσία συμπλόκων αφλατοξίνης-αλβουμίνης σε δείγματα του ομφάλιου λώρου.

Η οξεία ανθρώπινη αφλατοξίκωση είναι σπάνια, ειδικά στις ανεπτυγμένες χώρες, όπου τα επίπεδα μόλυνσης μέσω των τροφίμων και παρακολουθούνται και ελέγχονται. Ωστόσο, υπήρξαν κρούσματα σε ορισμένες αναπτυσσόμενες χώρες, κυρίως στην υποσαχάρια Αφρική, όπου ο αραβόσιτος και οι αραχίδες αποτελούν σημαντικό μέρος της διατροφής, και όπου το κλίμα είναι κατάλληλο για την ταχεία ανάπτυξη μυκήτων στις σοδειές, τόσο στο χωράφι, όσο και στους χώρους αποθήκευσης, καθώς οι τεχνικές που αφορούν την πρόληψη της μυκητιακής ανάπτυξης, σπάνια εφαρμόζονται. Μία σημαντική εστία εκδηλώθηκε στην Ινδία το 1974, όταν περίπου 400 άτομα νόσησαν με πυρετό και ίκτερο, μετά από κατανάλωση μολυσμένου αραβόσιτου που περιείχε αφλατοξίνη σε τιμές μεταξύ 0,25 και 15 mg/kg και περισσότεροι από 100 από αυτούς πέθαναν. Τουλάχιστον δύο μεγάλες εστίες έχουν επίσης σημειωθεί στην Κένυα, με πιο πρόσφατη αυτή του 2004, όταν 317 άνθρωποι επλήγησαν και 125 έχασαν τη ζωή τους, πιθανώς σαν αποτέλεσμα μολυσμένου αραβόσιτου. Επιπλέον οι άνθρωποι για να φρουρήσουν τη σοδειά τους ενάντια στην κλοπή, αποθήκευσαν τον αραβόσιτο στα σπίτια τους, τα οποία ήταν θερμότερα και πιο υγρά από τους σιτοβολώνες όπου αποθηκεύονταν συνήθως. Όταν εξετάστηκαν τα δείγματα αραβόσιτου, βρέθηκαν ότι περιείχαν συγκεντρώσεις AFB1

μέχρι και 4400 ppb. Η ασθένεια χαρακτηρίστηκε από ίκτερο, ταχέως αναπτυσσόμενο ασκίτη, πυλαία υπέρταση και από ένα υψηλό ποσοστό θνησιμότητας. Η νεκροψία έδειξε ότι ο ιστός του ήπατος είχε υποστεί κεντρολόβια νέκρωση.

Είναι επιστημονικά τεκμηριωμένο ότι το ήπαρ αποτελεί το πρωταρχικό όργανο-στόχο σε πολλά είδη. Ωστόσο έχει παρατηρηθεί ογκογένεση και σε άλλα όργανα. Η παθογένεια αυτή εξηγείται από τον τρόπο μεταβολισμού και αποδόμησης των αφλατοξινών που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μεταβολίτες της AFB<sub>1</sub>, όπως το AFB<sub>1</sub> 2-3 εποξειδίο, επιδρούν στο DNA με σύνδεση και τροποποίηση της βάσης G, με συνέπεια την πρόκληση διαφόρων μεταλλάξεων στην κωδικοποίηση διαφόρων γονιδίων, κυρίως των ογκογόνων. Επιπλέον, μέσω της σύνδεσής της με το DNA, η AFB<sub>1</sub> συντελεί στον σχηματισμό κενών διαστημάτων στις έλικές του, καθώς αποτρέπει τη δράση της DNA πολυμεράσης στις περιοχές σύνδεσής της, γεγονός που από μόνο του οδηγεί σε μεταλλάξεις. Τέλος η AFB<sub>1</sub> έχει ενοχοποιηθεί για τερατογόνο δράση σε διάφορα είδη ζώων, καθώς παρεμποδίζει τη σύνθεση διαφόρων πρωτεϊνών των ευκαρυωτικών κυττάρων, γεγονός που συμβάλλει στη διαταραχή της διαφοροποίησης των ευαίσθητων αρχέγονων κυττάρων (Labbe and Garcia, 2001).

Τέλος, σχετικές έρευνες έδειξαν ότι το σύνδρομο Reye με συμπτώματα εγκεφαλοπάθειας και εκφυλισμού των λιπών στα παιδιά και η νόσος Kwashiorkor, που εμφανίζεται κυρίως σε παιδιά της Β. Αφρικής, παρόλο που συνήθως αποδίδεται σε διατροφικές ελλείψεις, μπορεί να συσχετιστεί και με την πρόσληψη αφλατοξίνης (Hendrickse et al., 1982). Η προκαλούμενη καταστροφή του ήπατος από τις αφλατοξίνες καθιστά τα παιδιά που πάσχουν από τη νόσο, λιγότερο ικανά να αφομοιώνουν πρωτεϊνούχα γεύματα, τα οποία συνήθως συνιστώνται στα πλαίσια της θεραπείας για τη νόσο (Newell, 1983).

Ιατρικές έρευνες έχουν αποδείξει ότι μία κανονική διατροφή που περιλαμβάνει λαχανικά, όπως τα καρότα, το σέλινο και ο μαϊντανός, μειώνει τις καρκινογόνες επιπτώσεις των αφλατοξινών.

Με δεδομένη την σοβαρότητα των επιπτώσεων στην υγεία των ζώων και των ανθρώπων, από την κατανάλωση αφλατοξινών μέσω της τροφικής αλυσίδας, την εκφρασμένη πλέον ευαισθητοποίηση της κοινωνίας σε θέματα που άπτονται της διατροφής και το αυξημένο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, η λήψη μέτρων για την πρόληψη και την αντιμετώπιση των αφλατοξικών θεωρείται άκρως απαραίτητη και απόλυτα επιβεβλημένη. Είναι προφανές ότι ο σχεδιασμός των

ενεργειών και η υλοποίηση των δράσεων που θα ακολουθήσει, πρέπει να επεκτείνεται στα εξής διαδοχικά επίπεδα:

- ✓ Την πρόληψη της μυκητιακής μόλυνσης στο στάδιο πριν τη συγκομιδή των ζωοτροφών.
- ✓ Την απαλλαγή των ζωοτροφών από τις αφλατοξίνες που έχουν ήδη αναπτυχθεί, μέσω της αδρανοποίησής τους.
- ✓ Τον εργαστηριακό έλεγχο, τον εντοπισμό, την αποφυγή χορήγησης και την απομάκρυνση των προσβεβλημένων ζωοτροφών.
- ✓ Την πραγματοποίηση συνεχών ελέγχων, στα πλαίσια εφαρμογής προγραμμάτων HACCP από τις βιομηχανίες, με σκοπό τον αποκλεισμό των μη ασφαλών για την υγεία των καταναλωτών προϊόντα.

## **2.6. Μέθοδοι πρόληψης και αντιμετώπισης της παρουσίας αφλατοξινών**

Η πρώτη δέσμη ενεργειών αναφέρεται στην πρόληψη σχηματισμού τους, που αποτελεί και τον ουσιαστικότερο και αποτελεσματικότερο τρόπο αντιμετώπισής. Στην Ευρώπη υπάρχει σήμερα η συνειδητοποίηση ότι, μία ολοκληρωμένη προσέγγιση του τύπου «από το αγρόκτημα στο τραπέζι», οφείλει να διασφαλίζει συνολικά και αποτελεσματικά την ασφάλεια και την υγιεινή των γεωργικών προϊόντων διατροφής. Το σκεπτικό αυτό ισχύει, τόσο για τον έλεγχο της μικροβιακής μόλυνσης των τροφίμων, όσο και αποτροπή παρουσίας των δυνητικά επιβλαβών καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων, καθώς και για άλλους ρυπαντές, όπως οι μυκοτοξίνες. Λόγω όμως της φύσης των απανταχού παρόντων μυκήτων, εκτιμάται ότι περίπου το 20% όλων των προϊόντων διατροφής (κυρίως φυτικής προέλευσης), είναι μολυσμένα με σημαντικές συγκεντρώσεις μυκοτοξινών.

### **2.6.1. Πρόληψη της ανάπτυξης μυκήτων και της παραγωγής αφλατοξινών στις πρώτες ύλες ζωοτροφών**

Στον αγρό η ανάπτυξη των υπεύθυνων μυκήτων του γένους *Aspergillus* παρεμποδίζεται με καλλιέργεια ανθεκτικών ποικιλιών και την εφαρμογή Ορθών Γεωργικών Πρακτικών σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, από το στάδιο της φύτευσης έως το στάδιο της συγκομιδής και της αποθήκευσης των καρπών. Ξεκινώντας από τον αγρό, η λίπανση του καλαμποκιού, που αποτελεί την κυριότερη ζωοτροφή, θα πρέπει να είναι ισορροπημένη σε ότι αφορά το  $N_2$ , το  $P_2O_5$

και το  $K_2O$ , ενώ θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για θεραπεία- ψεκασμούς με εντομοκτόνα σκευάσματα. Σε αντίθετη περίπτωση ανισορροπίας, το «μαλάκωμα» των φυτών τα καθιστά επιρρεπή σε επιθέσεις εντόμων και μυκήτων και άρα την παραγωγή αφλατοξινών (Munkvold, 2003). Γενικά, όλες οι συστάσεις-υποθέσεις που έχουν γίνει μέχρι στιγμής, εστιάζουν στην επαρκή λίπανση και άρδευση, που θα επιβάλλει ένα ελάχιστο stress στο φυτό. Η επαρκής γνώση της καλλιέργειας και της ιστορίας της διαχείρισης της περιοχής, η οποία προορίζεται για την καλλιέργεια του καλαμποκιού, είναι αναγκαίες προϋποθέσεις για την βελτίωση της πιθανότητας παραγωγής δημητριακών, χωρίς αφλατοξίνες. Αναλύσεις του εδάφους είναι απαραίτητες για την αξιολόγηση των αναγκών των φυτών σε λίπασμα. Το καλαμπόκι απαιτεί γενικά υψηλότερο pH εδάφους και περισσότερο άζωτο από ότι οι περισσότερες άλλες καλλιέργειες. Επίσης, η χρήση συγκεκριμένων τεχνικών καλλιέργειας, όπως η αμειψισπορά και η αποφυγή συνεχούς καλλιέργειας με περιστροφές, οδηγούν στην ελαχιστοποίηση της μόλυνσης (Widstrom, 1992) και συνήθως συνιστώνται ως αποτελεσματικές στην πράξη (Wilson et al., 1989b).

Η προφύλαξη των φυτών από την προσβολή εντόμων και παρασίτων που προκαλούν τραυματισμούς, με τη χρήση φυτοπροστατευτικών χημικών ουσιών, βελτιώνουν την ιδανική ανάπτυξη και άμυνα των φυτών. Από πολύ νωρίς εκθέσεις συσχετίζουν τη μόλυνση του καλαμποκιού με αφλατοξίνες, με τα έντομα (Tanbenhaus, 1920). Πολλά λεπιδόπτερα ταυτοποιήθηκαν ως συμμετέχοντα στη μόλυνση, με την πυραλίδα του αραβοσίτου (*Ostrinia nubilalis*, Hubner) να έχει συνδεθεί με την υψηλότερη συγκέντρωση αφλατοξίνης (Widstrom et al., 1975). Έτσι η αντίσταση στα έντομα αποτελεί έναν κρίσιμο παράγοντα για την επιλογή των υβριδίων από τον καλλιεργητή. Έντομα επίσης, όπως αυτά του γένους *Phytophagus* μπορούν να δράσουν σαν υποδοχείς σπόρων μυκήτων ή να αναπτύξουν κρίσιμα σημεία στη μάζα των προϊόντων που προδιαθέτουν στην μυκητιακή ανάπτυξη και την παραγωγή τοξινών. Τέλος, διάφοροι κύνθοροι του αραβοσίτου (π.χ. ο *Sitophilis zeamais*, Motschulsky) έχουν επίσης αποδειχθεί αποτελεσματικοί στη μεταφορά του μύκητα στα αυτιά του καλαμποκιού.

Η υγρασία του καλαμποκιού κατά τη διάρκεια παρασκευής του ενσιρώματος, θα πρέπει να είναι σχετικά υψηλή, ενώ το μήκος κοπής-τεμαχίου, θα πρέπει να είναι κοντό (0,8-1,5 cm) (Pietri et al., 2004b; Reyneri et al., 2004). Επίσης θα πρέπει να ακολουθούνται όλες εκείνες οι πρακτικές οι οποίες εγγυώνται μία γρήγορη ενεργοποίηση της γαλακτικής ζύμωσης, κατά τη διάρκεια του κλεισίματος-



σφραγίσματος του σιρού. Η χρήση οργανικών οξέων (π.χ. προπιονικού) είναι επιθυμητή, καθώς έχειδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικά στην μείωση της μυκητιακής ανάπτυξης και του σχηματισμού μυκοτοξινών. Το βάθος της ημερήσιας προοδευτικής κοπής του μετώπου της μάζας του ενσιρώματος, θα πρέπει να είναι 30 cm το χειμώνα και 60-80 cm το καλοκαίρι (Reyneri et al., 2004 ; Pietri et al., 2004b). Καθώς όμως η μόλυνση του καλαμποκιού από τον *A. flavus* κυρίως λαμβάνει χώρα στο χωράφι, η πρόληψη της μυκητιακής μόλυνσης στο στάδιο πριν την συγκομιδή του, αποτελεί τον καλύτερο τρόπο ελάττωσης του κινδύνου μόλυνσης και εγγύησης παραγωγής ασφαλών τροφίμων. Επίσης διάφοροι μικροοργανισμοί έχουν προταθεί σαν παράγοντες βιοελέγχου των *A. flavus* και της μόλυνσης από αφλατοξίνες πριν την συγκομιδή, εκμεταλλεζόμενοι τον μηχανισμό του βιο-ανταγωνισμού (Avantaggiato and Visconti, 2003; Pietri et al., 2004b).

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, η χαμηλή υγρασία και θερμοκρασία, ο επαρκής αερισμός και ο έλεγχος των εντόμων-τροφικών, συμβάλλουν στην αποτροπή ανάπτυξης αφλατοξινών στους καρπούς (Weidenborner, 2001).

### **2.6.2. Μέθοδοι αδρανοποίησης αφλατοξινών**

Εάν παρόλα αυτά, τα προληπτικά μέτρα δεν αποδώσουν, η περιεκτικότητα των ζωοτροφών σε AFB<sub>1</sub> μπορεί να μειωθεί με άλεση ή την εφαρμογή φυσικής ή χημικής επεξεργασίας.

Η φυσική κατεργασία των ζωοτροφών περιλαμβάνει την εκχύλιση με τη χρήση διαλυτών, την θέρμανση, την ακτινοβολία με μικροκύματα, ακτίνες γ, ακτίνες X και υπεριώδη ακτινοβολία καθώς και την προσρόφηση των αφλατοξινών σε HSCAS (Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate) και άλλα αδρανή υλικά, τεχνική που εφαρμόζεται τακτικά, τόσο στη βιομηχανία παραγωγής ζωοτροφών, όσο και στις κτηνοτροφικές μονάδες, για τη μείωση της συγκέντρωσης της AFB<sub>1</sub> στο γάλα (Creppy, 2002). Εάν οι συνθήκες αποθήκευσης των πρώτων υλών δεν είναι οι κατάλληλες, ή η υγρασία τους είναι υψηλή, συνιστάται η προσθήκη ιδιοσκευασμάτων που δεσμεύουν τις μυκοτοξίνες που έχουν ήδη παραχθεί, ώστε να μειωθεί η απορρόφησή τους από τον πεπτικό σωλήνα των ζώων. Τέτοια ιδιοσκευάσματα περιέχουν ορυκτές ύλες με αργίλιο, ζεόλιθο, ενεργό άνθρακα, φολλικό οξύ, εστεροποιημένες γλυκομαννάνες, και πολυμερή πορώδη υλικά, όπως η πολυβινυλοπυρολιδόνη. Επίσης υπάρχουν ουσίες που περιέχουν ένζυμα, όπως π.χ.

εποξυδάση και λακτονάση και μικροοργανισμοί με αντιμυκοτοξινική δράση, όπως ο *Saccharomyces cerevisiae* 3 (Plank et al., 1990, Lindemann et al., 1992, Αλεξόπουλος 1997, Papaioannou et al., 2002a, 2002b).

Οι Smith et al. (1993) έχουν περιγράψει τα κύρια χαρακτηριστικά ενός προϊόντος που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την απορρόφηση μυκοτοξινών. Ένα τέτοιο προϊόν πρέπει να δρα γρήγορα και να είναι έτσι δομημένο έτσι, ώστε να καταπολεμά κάθε είδος μυκοτοξίνης. Πρέπει να είναι σταθερό σε ένα ευρύ φάσμα pH, και αποτελεσματικό στην τροφή σε μικρές συγκεντρώσεις. Οι Masimango et al., (1978) προσδιόρισαν ότι ο μπετονίτης μπορεί να προσροφήσει το 94-100% της αρχικής AFB<sub>1</sub> που υπάρχει σε υδατικά διαλύματα. Επίσης οι Phillips et al., (1988) αξιολόγησαν τη χρήση του αλουμινίου, των σιλικών και των αργιλοπυριτικών υλικών σε σχέση με την προσρόφηση της αφλατοξίνης από το νερό και τη μείωση της τοξικότητάς της, στα κοτόπουλα. Γενικά, πολλές ερευνητικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η προσθήκη αργίλου μπορεί να μειώσει αποτελεσματικά την τοξικότητα της αφλατοξίνης στα ζώα. Ο προσδιορισμός του μηχανισμού προσρόφησης της αφλατοξίνης σε αργίλους, θα μπορούσε να διευκολύνει την αναγνώριση ή/και την προετοιμασία πιο αποτελεσματικών προσροφητικών. Γενικά, παρότι πολλές πιθανές πρόσθετες ύλες, μετά την προσθήκη τους στις ζωοτροφές, απομακρύνουν αποτελεσματικά τις μυκοτοξίνες από το νερό (in vitro), δεν μπορούν να προστατεύσουν τα ζώα από την τοξικότητά τους (in vivo) παρά μόνον σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις, που δεν είναι πρακτικά εφαρμόσιμες στις ζωοτροφές.

Επιπλέον, η αποσύνθεση των αφλατοξινών επιτυγχάνεται μετά από έκθεσή τους στο ηλιακό φως. Η θερμική επεξεργασία που ξεπερνά τους 250° C, είναι απαραίτητη προκειμένου να επιτευχθεί μία ικανοποιητική αποδόμηση των αφλατοξινών (Weidenborner, 2001).

Σε ότι αφορά την εφαρμογή χημικών μεθόδων, η πιο αποτελεσματική μέθοδος αποδόμησης των αφλατοξινών, θεωρείται η χρήση της αμμωνίας. Η αμμωνία προκαλεί τη διάσπαση του δακτυλίου της AFB<sub>1</sub> με επακόλουθο την αποδόμησή της. Χρησιμοποιείται σε παραγωγική κλίμακα για την εξυγίανση των ζωοτροφών, όπως του καλαμποκιού, και του βαμβακόσπορου, στη Γαλλία και τις Η.Π.Α. (Weidenborner, 2001). Με αυτή τη θεραπεία-επεξεργασία, απομακρύνεται αποτελεσματικά η καρκινογόνος δράση του αρχικού υλικού (Frayssinet and Lafarge-Frayssinet, 1990). Από την άλλη πλευρά όμως, η επεξεργασία τροφίμων με αμμωνία, που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη

ανεπιθύμητων οσμών και γεύσεων, άρα και σε φτωχή εμπορευσιμότητα. Πέρα όμως από αυτή, ένας μεγάλος αριθμός χημικών μέσων τα οποία αντιδρούν με τις αφλατοξίνες και τις μετατρέπουν σε λιγότερο τοξικά και μεταλλαξιγόνα συστατικά, έχουν κατά καιρούς προταθεί, όπως, οξέα, βάσεις, οξειδωτικοί παράγοντες και το δισουλφιδικό νάτριο. Οι περισσότερες όμως από αυτές τις χημικές διεργασίες είναι μη πρακτικές και μη ασφαλείς, ενώ παράλληλα υποβαθμίζουν τα διατροφικά, οργανοληπτικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των προϊόντων. Τα οξειδωτικά μέσα, όπως το όζον και το υπεροξειδίο του υδρογόνου, παρότι έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά στην απομάκρυνση των αφλατοξινών από τα φιστίκια, δεν έχουν καμία επίδραση στη μείωση της συγκέντρωσης της AFM<sub>1</sub> στο γάλα, εάν δεν συνοδεύονται από την κατάλληλη θερμική επεξεργασία.

Γενικά, η διαδικασία της αποτοξικοποίησης των μυκοτοξινών κοστίζει πολύ και είναι και δύσκολη. Για τον λόγο αυτό, οι οδηγίες που εκδίδονται από τους οργανισμούς ελέγχου, αναφέρουν ως προτιμότερη δράση την πρόληψη των μολύνσεων από τοξινογόνους μύκητες (Brera et al., 2008).

Τέλος, οι αφλατοξίνες είναι δυνατό να δεσμεύονται και να μεταβολίζονται από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς, γεγονός που μπορεί να αποβεί ευεργετικό σε αρκετές περιπτώσεις. Σημαντικότερες επιτυχίες στον βιολογικό έλεγχο της μόλυνσης από αφλατοξίνες, τόσο σε προ-, όσο και σε μετά τη συγκομιδή επίπεδο καλλιέργειών, έχουν επιτευχθεί με την εφαρμογή ανταγωνιστικών, μη τοξινογόνων στελεχών του *A. flavus* και *A. parasiticus*, σε πολλά πειράματα, ιδιαίτερα με φιστίκι και βαμβάκι. Η μείωση ήταν της τάξης του 70-90% (Dorner, 2004; Pitt and Hocking, 2006; Dorner, 2008). Πρόσφατα, δύο τέτοια προϊόντα μη τοξινογόνων στελεχών έχουν λάβει στις Η.Π.Α. καταχώρηση από την Υπηρεσία Περιβαλλοντικής Προστασίας (EPA), ως βιολογικά φυτοφάρμακα για τον έλεγχο της μόλυνσης από αφλατοξίνες, σε βαμβάκι και φιστίκια, σε αρκετές Πολιτείες (Dorner, 2004). Η στρατηγική αυτή βασίζεται στην εφαρμογή του μη τοξινογόνου στελέχους η οποία και αποκλείει φυσικά ανταγωνιστικά τοξικά στελέχη, για την ίδια θέση, μέσω του ανταγωνισμού υποστρωμάτων για την καλλιέργεια. Επιπρόσθετα, αυτός ο παράγοντας βιοελέγχου έχει δοκιμαστεί και για τον έλεγχο της αφλατοξίνης στο καλαμπόκι, μέσω διαδικασίας μόλυνσης με τοξινογόνο στέλεχος του *A. flavus*, με επίσης καλά αποτελέσματα (Brown et al., 1991).

Επίσης, μερικά σαπροφυτικά είδη ζυμών (όπως η *Candida krusei*) έχουν αφήσει πολλές υποσχέσεις σαν βιολογικοί παράγοντες ελέγχου ενάντια στον *A.*

*flavus*. Με δράση παρόμοια με τους βακτηριακούς παράγοντες, αυτά τα είδη των ζυμών είναι ικανά να αναστείλουν την ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus* κάτω από εργαστηριακές συνθήκες (Hua et al., 1999; Mason and Kalfoff, 2006).

Προβιοτικές ζύμες χρησιμοποιούνται ευρέως στη διατροφή των ζώων, εξαιτίας των θετικών αποτελεσμάτων τους στη μικροβιακή δραστηριότητα της μεγάλης κοιλίας (Chanchegias-Durand et al., 2008). Συμπληρωματικά, οι γλυκομαννάνες από τα κυτταρικά τοιχώματα ζυμών, έχουν βρεθεί ότι μειώνουν σημαντικά (περίπου κατά 60%) τη συγκέντρωση της AFM1 στο γάλα αγελάδων που καταναλώνουν σιτηρέσια μολυσμένα με AFB1 σε δόση 55 µg/kg (Diaz et al., 2004).

### **2.6.3. Εντοπισμός και απομάκρυνση των προσβεβλημένων με αφλατοξίνες ζωοτροφών**

Η υποψία αφλατοξίκωσης στα ζώα μιας εκτροφής συχνά γεννιέται μετά την κατανάλωση όλης της διαθέσιμης αποθηκευμένης τροφής. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο να λαμβάνονται δείγματα από όλες τις πρώτες ύλες ζωοτροφών της εκτροφής, πριν ή κατά τη διάρκεια της τοποθέτησής τους στους χώρους αποθήκευσης. Η δειγματοληψία των δημητριακών και των άλλων πρώτων υλών των ζωοτροφών πρέπει να είναι αντιπροσωπευτική της συνολικής ποσότητας που αποθηκεύεται στην εκτροφή (Κοινοτική Οδηγία 98/53/EK).

Όταν υπάρχει υποψία παρουσίας μυκήτων στις πρώτες ύλες των ζωοτροφών, η πρώτη κτηνιατρική παρέμβαση πρέπει να είναι η άμεση απομάκρυνση των πρώτων υλών. Αυτό έχει ευεργετική επίδραση ακόμα και στις περιπτώσεις όπου δεν είναι δυνατή η αναγνώριση της υπαίτιας μυκοτοξίνης. Ταυτόχρονα πραγματοποιείται επισταμένος έλεγχος και καθαρισμός των χώρων αποθήκευσης των ζωοτροφών, των μηχανημάτων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του σιτηρεσίου και του συστήματος παράθεσης της τροφής, κυρίως στα σημεία εκείνα που είναι πιθανό να εμφανιστεί ανάπτυξη μυκήτων λόγω συνθηκών υψηλής υγρασίας. Επιπλέον τα τοιχώματα των αποθηκευτικών χώρων πρέπει να πλένονται με υποχλωριώδες διάλυμα ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης των τροφών. Μετά τον καθαρισμό, όλοι οι χώροι και τα μηχανήματα που έρχονται σε επαφή με την τροφή, πρέπει να είναι απολύτως στεγνά πριν την επανατοποθέτηση τροφής σε αυτά (Αλεξόπουλος 1997, Osweiler 1999, Κυριάκης et al., 2000, 2003).

Όλες οι ύποπτες ζωοτροφές πρέπει να εξετάζονται για την ανίχνευση κάποιας γνωστής μυκοτοξίνης. Η αποθήκευση των ζωοτροφών σε συνθήκες σχετικής υγρασίας >70% και συγκέντρωσης οξυγόνου >0,5%, πρέπει να αποφεύγεται. Ιδανικές συνθήκες υγρασίας για αποθήκευση βραχείας διάρκειας, είναι η τιμή 14% (λιγότερο από 3 μήνες) και 12% για μεγαλύτερη διάρκεια αποθήκευσης (από 3 μήνες-3 χρόνια). Επίσης οι σπόροι θα πρέπει να καθαριστούν πριν και μετά τη διαδικασία ξήρανσης, περνώντας τους από κόσκινα, και να αεριστούν, έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι ακαθαρσίες, η σκόνη, τα θραύσματα και τα κομμάτια. Επίσης, μία μικρής διάρκειας ψύξη των σπόρων, μέσα από το πέρασμά τους από ψυκτική διάταξη, είναι επιθυμητή, με σκοπό να οδηγήσει τη μάζα σε θερμοκρασία μικρότερη των 20°C. Επίσης οι αποθήκες αποθήκευσης και τα σιλό, θα πρέπει να καθαρίζονται σχολαστικά στο τέλος της περιόδου, με σκοπό την μηχανική απομάκρυνση των υπολειμμάτων οτιδήποτε υπάρχει προσκολλημένο στους τοίχους και τα πατώματα. Επικουρικά, θα πρέπει να γίνει πρόληψη θεραπείας με συγκεκριμένα εντομοκτόνα, αντιμυκητιακά και μυοκτόνα φάρμακα. Επιπλέον, παρόλο που είναι δύσκολο να εφαρμοστεί σε ευρεία κλίμακα και δαπανηρό, η ακτινοβολήση των σπόρων με ακτίνες γ- πριν την αποθήκευση, θα μπορούσε να είναι χρήσιμη στρατηγική μείωσης της μόλυνσης από *A. flavus* και *A. parasiticus* (Pietri et al., 2004b).

#### **2.6.4. Μέθοδοι μείωσης της συγκέντρωσης της AFM<sub>1</sub> στα γαλακτοκομικά προϊόντα**

Σε περίπτωση που διαπιστωθεί η παρουσία της AFM<sub>1</sub> στο γάλα που θα χρησιμοποιηθεί σαν πρώτη ύλη για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων, έχουν προταθεί οι ακόλουθες διορθωτικές ενέργειες:

Οι Pierides και συν. (2000) εξέφρασαν την άποψη ότι ορισμένα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν την AFM<sub>1</sub> και κατά συνέπεια να μειώνουν την συγκέντρωσή της στο γάλα και τα προϊόντα που παρασκευάζονται από αυτό. Αρκετοί μικροοργανισμοί που περιλαμβάνουν βακτήρια και μύκητες που παράγουν οξέα, μπορούν να μεταβολίσουν και να αδρανοποιήσουν αφλατοξίνες, με τον *Flavobacterium aurantiacum* να είναι ο περισσότερο ενεργός. Διαφορετικά βακτηριακά είδη, όπως *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Ralstonia* spp., *Burkholderia* spp., κ.α. έχουν επιδείξει αυξημένη ικανότητα αναστολής μυκητιακής ανάπτυξης και παραγωγής αφλατοξινών. Έχει

υποστηριχτεί ότι η αδρανοποίηση αυτή είναι το αποτέλεσμα της παραγωγής οξέος και της μετατροπής της AFB<sub>1</sub> σε AFB<sub>2a</sub>, η οποία είναι 1000 φορές λιγότερο μεταλλαξιγόνο σε σχέση με την μητρική τοξίνη (Park and Liang, 1993).

Επίσης, η διαδικασία παρασκευής της γιαούρτης φαίνεται ότι μειώνει την συγκέντρωση της AFM<sub>1</sub>, σε σύγκριση με αυτή του γάλακτος, εξαιτίας της δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ωστόσο δεν την εξαλείφει. Φαίνεται επίσης ότι αυτό το ποσοστό μείωσης εξαρτάται από το pH. Οι Govaris και συν. (2002) παρατήρησαν ότι η AFM<sub>1</sub> μειώθηκε περισσότερο κατά την παρασκευή γιαούρτης σε pH 4,0 από ότι σε pH 4,6.

Τέλος, ο μεταβολισμός της AFB<sub>1</sub> σε εποξειδίου και στη συνέχεια σε AFM<sub>1</sub> μπορεί να αποκλειστεί *in vitro* (ανθρώπινα ηπατοκύτταρα) και *in vivo* (αρουραίοι), μετά από θεραπεία με oltipraz, ένα αντισχιστοσωματικό φάρμακο, το οποίο εμποδίζει το σχηματισμό του εποξειδίου και επάγει το σημαντικότερο ένζυμο αποτοξίνωσης από την αφλατοξίνη, την γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση (GST). Το Oltipraz έχει δοκιμαστεί στις φάσεις I & II των κλινικών δοκιμών στην Κίνα, για την πρόληψη του καρκίνου του ήπατος.

## 2.7. Στοιχεία νομοθεσίας

Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία κατατάσσει τις μυκοτοξίνες στους επιμολυντές των τροφίμων (Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006). Με δεδομένο ότι οι τρέχουσες επιστημονικές και τεχνικές γνώσεις, καθώς και οι εφαρμοζόμενες πρακτικές παραγωγής και αποθήκευσης, δεν μπορούν να αποκλείσουν την ανάπτυξη των διαφόρων μυκήτων και κατά συνέπεια να απαλείψουν πλήρως τις μυκοτοξίνες από τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές, συνιστάται να περιορίζεται η παρουσία τους στο κατώτατο εφικτό επίπεδο. Αναμφίβολα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη ιδιαίτερα οι πιο ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού, και κυρίως τα βρέφη.

Η θέσπιση των ανώτατων ορίων παρουσίας των μυκοτοξινών στα τρόφιμα, αποτελεί μία σύνθετη υπόθεση. Για την οριοθέτηση των μέγιστων συγκεντρώσεων απαιτείται συνυπολογισμός και συνεκτίμηση πολλών παραγόντων, όπως τα τοξικολογικά δεδομένα, ο μεταβολισμός αυτών των ουσιών, η οξεία και χρόνια τοξικότητα. Παράλληλα πρέπει να συνδυάζονται τα δεδομένα αυτά με την παρουσία των τοξινών στα τρόφιμα και την ποσότητα στην οποία εκτίθενται οι καταναλωτές. Σήμερα δεν είναι γνωστό κάποιο όριο κάτω από το οποίο να μην παρατηρούνται αρνητικές επιδράσεις στην υγεία του καταναλωτή από τις μυκοτοξίνες, συνεπώς δεν

μπορεί να οριστεί αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (Acceptable Daily Intake, ADI). Είναι ενδιαφέρον να σημειώσουμε, ότι μία ολική ημερήσια πρόσληψη (Total Daily Intake, TDI) της τάξης των 0,2 ng/kg b.w. (14-15ng/person), για ένα μέσο βάρος των 70 kg, αποτελεί για τα Ευρωπαϊκά δεδομένα, μία σημαντική δόση (Caggioni and Pietri, 1999; JECFA, 2001).

Νομοθετικοί κανονισμοί για τις μυκοτοξίνες υπάρχουν σε πάνω από 100 χώρες παγκοσμίως. Προς το παρόν, τα μέγιστα επίπεδα για την AFM<sub>1</sub> στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, ποικίλλουν στις διάφορες χώρες, γεγονός που αποδίδεται στην διαφορετική αξιολόγηση επικινδυνότητας ή στην διαφορετική οικονομική θεώρηση (Stoloff et al., 1991). Στις ανεπτυγμένες χώρες, όπου η διάρκεια ζωής έχει αυξηθεί και η ποιότητα ζωής έχει βελτιωθεί, παρατηρείται μεγαλύτερη προσπάθεια για τον έλεγχο των αφλατοξινών. Αντίθετα, στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου το κύριο μέλημα παραμένει η καταπολέμηση της φτώχειας και των ασθενειών, η θέσπιση των Κανονισμών, ή η εφαρμογή τους γενικότερα, δεν είναι το ίδιο αυστηροί. Στην πράξη, τα διαφορετικά όρια που έχουν θεσπιστεί στις διάφορες χώρες του κόσμου, προκαλούν ενδεχόμενα προβλήματα στο διεθνές εμπόριο, εις βάρος συνήθως των λιγότερο ανεπτυγμένων χωρών.

Οι λόγοι της έλλειψης δράσης για την αντιμετώπιση του προβλήματος στις χώρες με χαμηλό εισόδημα είναι: α) η ελλιπής γνώση των μυκοτοξινών και του πλήρους εύρους των δυσμενών επιπτώσεων τους στην υγεία και άρα και η ανεπάρκεια της κοινοποίησης των κινδύνων από αυτές, β) η σχετικά μικρή αντιληπτή αξία των παρεμβάσεων για τη μείωση της μόλυνσης, σε ανθρώπους χαμηλών εισοδημάτων, συγκριτικά με π.χ. προγράμματα εμβολιασμού, γ) η πολυπλοκότητα της προσέγγισης που απαιτεί την εξέταση σε πολλά σημεία, πριν και μετά τη συγκομιδή, δ) οι υψηλότερες τιμές έκθεσης εμφανίζονται σε κοινότητες που παράγουν και καταναλώνουν την τροφή τους και επομένως κανονιστικά μέτρα για τον έλεγχο της έκθεσης, είναι σε μεγάλο βαθμό αναποτελεσματικά, ε) το πρόβλημα συνδέεται με τον σχεδιασμό της γενικότερης πολιτικής για την γεωργία, την υγεία και την οικονομία, γεγονός που απαιτεί μία προσέγγιση σε κυβερνητικό επίπεδο, προσέγγιση που είναι σχετικά απύουσα.

Σήμερα, οι περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες του κόσμου (πάνω από 60), με δεδομένη την ευαισθησία της κοινωνίας και το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για τις επιπτώσεις της κατανάλωσης τροφίμων στη Δημόσια Υγεία, έχουν θεσπίσει ρυθμιστικά όρια για τη συγκέντρωση των αφλατοξινών στις ζωοτροφές και

το γάλα. Παγκοσμίως τα νομοθετικά όρια έχουν πρόσφατα ανασκοπηθεί από τους van der Westhuizen et al. (2002), ο οποίος και κατέγραψε ότι, 77 χώρες έχουν συγκεκριμένους κανονισμούς για τις μυκοτοξίνες, 13 χώρες δεν έχουν συγκεκριμένους κανονισμούς, ενώ απουσία δεδομένων χαρακτηρίζουν περίπου 50 χώρες, πολλές από τις οποίες βρίσκονται στην Αφρική.

Έχουν γίνει προσπάθειες για να βρεθεί μία συναίνεση σε διεθνές επίπεδο, με την εναρμόνιση των επιπέδων των νομοθεσιών, μέσω του Codex Alimentarius, με την πρόταση ότι το ανώτατο συνολικό επίπεδο αφλατοξίνης στα τρόφιμα, θα πρέπει να καθοριστεί στα 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Ωστόσο οι χώρες οι οποίες έχουν ήδη θεσπίσει αυστηρότερα όρια, στη βάση των καρκινογόνων ιδιοτήτων των αφλατοξινών, είναι απίθανο να συμφωνήσουν. Ένα επίσης σημαντικό πρόβλημα στη θέσπιση οποιασδήποτε διεθνούς νομοθεσίας, είναι η δυσκολία στον καθορισμό αναλυτικής μεθοδολογίας, και ιδίως η δυσκολία της δειγματοληψίας. Όλα αυτά τα προβλήματα έχουν αναφερθεί από τους Jewers et al., το 1986.

Η νομοθεσία που αναφέρεται στις αφλατοξίνες στις ζωοτροφές δίνει ιδιαίτερη προσοχή στην  $\text{AFB}_1$ , η οποία και υποδηλώνεται στην Οδηγία 2003/100/ ΕΚ για τα ανεπιθύμητα συστατικά των ζωοτροφών. Σύμφωνα με την Οδηγία 99/29 ΕΕ, έχει θεσπιστεί ως ανώτατο επιτρεπτό όριο για την  $\text{AFB}_1$  σε όλες τις αμιγείς ζωοτροφές τα 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , εκτός από τα ειδικά σιτηρέσια, όπως το πλήρες σιτηρέσιο γαλακτοπαραγωγών αγελάδων για το οποίο το μέγιστο όριο τίθεται στα 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , το πλήρες σιτηρέσιο μόσχων και αμνών με 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , και το πλήρες σιτηρέσιο χοιρινών και πτηνών με 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Βάσσοις, 2004). Στις Η.Π.Α. ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (F.D.A.) ορίζει ως ανώτατη επιτρεπτή συγκέντρωση αφλατοξίνης, τα 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  για τον αραβόσιτο που προορίζεται για σιτηρέσια αγελάδων γαλακτοπαραγωγής, όπως επίσης και στις τροφές για ανθρώπινη κατανάλωση. Ωστόσο οι καταναλωτές ασκούν πίεση, ώστε το όριο αυτό να μηδενιστεί (Creppy, 2002).

Σχετικά με την  $\text{AFM}_1$ , τα επίσημα μέγιστα νομοθετικά όρια ανίχνευσής της στο γάλα, προσδιορίζονται από την Ευρωπαϊκή Ένωση και τις Επιτροπές του Κώδικα Τροφίμων (Codex Alimentarius Commissions, 2001), στα 0,05  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ή 50ng/kg [Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 165/2010, ο οποίος τροποποίησε τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ.1881/2006], ενώ, από τον FDA στις Η.Π.Α. στα 500 ppt (500 ng/kg) (FAO, 1997; Diaz, 2002), δηλ. την δεκαπλάσια ποσότητα. Στα παρασκευάσματα για βρέφη και τα παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας, καθώς και στα διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται ειδικά για βρέφη, το όριο



ορίζεται στα 0,025 µg/kg (Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 165/2010) και στα 0,010 µg/kg στην Ελβετία.

Για το τυρί δεν έχουν θεσπιστεί όρια από την Ευρωπαϊκή Ένωση, ενώ η Τουρκία, η Αυστρία και η Ελβετία έχουν ορίσει ένα ανώτατο όριο ανοχής για την AFM<sub>1</sub>, στα 250 ng/kg (Κανιου-Grigoriadou et al. 2005; Prandini et al., 2008; Tekinsen and Ukar, 2008), η Ολλανδία, στα 200 ng/kg και τέλος, η Ιταλία στα 450 ng/kg (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2:** Ανώτερα επιτρεπόμενα νομοθετικά όρια συγκέντρωσης της AFM<sub>1</sub> στο γάλα και τα προϊόντα του, σε διάφορες χώρες (Πηγή: Creppy, 2002; Celik et al., 2005; Colak et al., 2006).

Χώρα	Γάλα (µg/kg)	Γαλακτοκομικά προϊόντα (µg/kg)
Ευρωπαϊκή Ένωση	0,05	0,05
Ελλάδα	0.05	
Αυστρία	0,05	0,02 (βούτυρο)
	0,01 (παστεριωμένο βρεφικό γάλα)	0,25 (τυρί)
		0,4 (σκόνη γάλακτος)
Γαλλία	0,05 (γάλα ενηλίκων)	
	0,03 (παιδιά <3 ετών)	
Ελβετία	0,05	0,025 (γάλα, ορός γάλακτος)
		0,25 (τυρί)
		0,02 (βούτυρο)
Βουλγαρία	0,50	0,10 (σκόνη γάλακτος)
Ρουμανία	0	0
Η.Π.Α.	0,50	
Βραζιλία	0,50	5,0 (σκόνη γάλακτος)
Αργεντινή	0,05	0,50 (προϊόντα γάλακτος)
Νιγηρία	1	
Αίγυπτος	0	0
Τουρκία	0,05	0,25 (τυρί)

## 2.8. Μέθοδοι ανίχνευσης και προσδιορισμού της συγκέντρωσης των αφλατοξινών

Αρκετές μέθοδοι ανάλυσης έχουν κατά καιρούς εφαρμοστεί για τον ανίχνευση της AFM<sub>1</sub> στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, είτε ποιοτικές για έλεγχο διαλογής, είτε για ποσοτικό προσδιορισμό (Tajik et al., 2007). Όταν οι έλεγχοι διεξάγονται με σκοπό να επιβεβαιωθεί η συμμόρφωση των προϊόντων με τα θεσμοθετημένα μέγιστα επιτρεπτά όρια, είναι ζωτικής σημασίας, το τελικό αναλυτικό αποτέλεσμα να εκφράζει την πραγματική τιμή, ώστε οι μέθοδοι ανάλυσης να είναι ακριβείς, αξιόπιστες και επικυρωμένες.

Αν δεν επιτυγχάνεται κάτι τέτοιο, είναι δυνατό πολλά προϊόντα να απορρίπτονται χωρίς λόγο, ή αντίστροφα, προβληματικές παρτίδες να γίνονται αποδεκτές, προξενώντας κινδύνους στην υγεία και την ασφάλεια των καταναλωτών, καθώς επίσης και σοβαρές επιπτώσεις στην οικονομία και το παγκόσμιο εμπόριο. Ο Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 882/2004 στις γενικές απαιτήσεις για τις μεθόδους ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των τροφίμων, αναφέρει ότι, οι μέθοδοι ανάλυσης πρέπει να χαρακτηρίζονται από τα ακόλουθα κριτήρια: α) ορθότητα, β) ευκολία εφαρμογής, γ) όριο ανίχνευσης, δ) όριο προσδιορισμού, ε) ακρίβεια (μέσω διεργαστηριακής δοκιμής), στ) επαναληψιμότητα, ζ) αναπαραγωγιμότητα, η) ανάκτηση, θ) επιλεκτικότητα, ι) ευαισθησία, ια) γραμμικότητα, ιβ) θέματα αβεβαιότητας των μετρήσεων, ιγ) άλλα κριτήρια που μπορούν να επιλέγονται ανάλογα με τις ανάγκες.

Για την ανάλυση των αφλατοξινών στα τρόφιμα είναι διαθέσιμες στη βιβλιογραφία διάφορες μέθοδοι, καθώς και οι επίσημες μέθοδοι του AOAC (Association of Analytical Communities).

Πριν από την ανάλυση των τροφίμων για τον έλεγχο ανίχνευσης μυκοτοξινών, προηγούνται μία σειρά λειτουργιών, στις οποίες περιλαμβάνονται: α) η δειγματοληψία, β) η προετοιμασία του δείγματος, γ) η εκχύλιση των μυκοτοξινών από το δείγμα, δ) ο καθαρισμός και τέλος, ε) ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός.

Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι είναι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC), η υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid

Chromatography, HPLC) συνδυασμένη με ανιχνευτή φθορισμού ή φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS) και η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) (Γεωργαλά και συν. 2009). Οι τρεις πρώτες στηρίζονται στην μέτρηση της έντασης φθορισμού τους, στο υπεριώδες φως (UV light). Παρόλο που η TLC ήταν η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της AFM1 (Wang, 2010), τα τελευταία χρόνια έχει αντικατασταθεί από την HPLC και τις τεχνικές φθορισμομετρίας. Από την άλλη μεριά, και η μέθοδος HPLC εμφανίζει σοβαρά μειονεκτήματα, καθώς περιλαμβάνει πολλά στάδια κατά την προετοιμασία του δείγματος με αποτέλεσμα να απαιτεί αρκετό χρόνο, πολλούς χημικούς διαλύτες και καλά εξειδικευμένο προσωπικό (Wang, 2010).

Για όλους αυτούς τους λόγους, σε επίπεδο καθημερινής πράξης, αλλά και σε ερευνητικό επίπεδο, προτιμώνται περισσότερο οι ανοσολογικές μέθοδοι, έναντι των χρωματογραφικών μεθόδων (Colak et al., 2006). Από τις ανοσολογικές τεχνικές, η περισσότερο χρησιμοποιούμενη τα τελευταία χρόνια είναι η ELISA (Zheng et al., 2006).

Η μέθοδος ELISA χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών για περισσότερα από 10 χρόνια. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στην ικανότητα ενός ειδικού αντισώματος να διακρίνει και να προσδιορίσει (ποιοτικά και ποσοτικά) την τρισδιάστατη δομή μιας συγκεκριμένης μυκοτοξίνης (Zheng et al., 2006). Είναι ουσιαστικά ένα ευέλικτο σύστημα ποσοτικού προσδιορισμού αντιγόνων και αντισωμάτων. Στηρίζεται στην ανάπτυξη και εμφάνιση χρώματος από ένα αντίσωμα ή αντιγόνο που φέρει ένα ένζυμο-δείκτη, το οποίο προκαλεί υδρόλυση ενός χρωμογόνου υποστρώματος.

Πρόκειται για μία μέθοδο η οποία χρησιμοποιείται καταρχήν σε επίπεδο ελέγχου διαλογής, χάρη των πολλαπλών πλεονεκτημάτων της, όπως η ταχύτητα λήψης αποτελεσμάτων, η ευκολία στην χρήση και το χαμηλό της κόστος εφαρμογής (Cigic and Prosen, 2009). Ο συνδυασμός της υψηλής ειδικότητας της ένωσης των αντιγόνων με τα ειδικά για αυτά αντισώματα, καθώς και η χαρακτηριστική ευαισθησία της ανίχνευσης ενός ενζύμου, καθιστούν τη συγκεκριμένη μέθοδο ιδανική για τον προσδιορισμό των αναλυτών σε σύνθετα μείγματα πολλαπλών συστατικών, χωρίς να απαιτείται να προηγηθεί της ανάλυσης κάποιος διαχωρισμός ή να διενεργηθεί απομάκρυνση άλλων προσμείξεων (Goryacheva et al., 2008). Η ELISA προτιμάται ιδιαίτερα καθώς απαιτεί μικρούς όγκους δειγμάτων, και λιγότερες διαδικασίες προετοιμασίας του δείγματος συγκριτικά με τις TLC και HPLC και

παρέχει ικανοποιητική ευαισθησία και ειδίκευση (Zheng et al., 2006). Σε ότι αφορά την ακρίβεια της μεθόδου, αυτή εξαρτάται από φύση της μυκοτοξίνης, τη τεχνική προετοιμασίας του δείγματος και τη φύση του υλικού, ενώ ένας προηγούμενος διαχωρισμός επιτρέπει τη βελτίωση της ακρίβειας και της αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου (Coryacheva et al., 2008).

# ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1. Συλλογή δειγμάτων

Δείγματα πρόβειου και αίγειου γάλακτος συλλέχθηκαν από το Νοέμβριο μέχρι το Φεβρουάριο του 2013 κατά τη διάρκεια του οποίου χρονικού διαστήματος τα αρμεγόμενα ζώα δεν βόσκουν, αλλά τρέφονται με συμπυκνωμένες ζωοτροφές, που έχουν συγκομιστεί το καλοκαίρι.

Συνολικά συλλέχθηκαν 50 δείγματα νοπού αιγοπρόβειου γάλακτος (35 δείγματα πρόβειου και 15 αίγειου γάλακτος), από διαφορετικούς παραγωγούς που δραστηριοποιούνται στην περιοχή της Θεσσαλίας. Τα δείγματα του πρόβειου γάλακτος προέρχονταν από μικρής και μεσαίας δυναμικότητας μονάδες, που εκτρέφουν το πολύ μέχρι 200 ζώα η καθεμία, εγχώριων ως επί το πλείστον φυλών, που παράγουν μέχρι 40-50 τόνους γάλα ετησίως.

Όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της αξιολόγησης, ελήφθησαν από νοπό γάλα παγολεκάνης μετά την πρωινή αρμεγή και είχαν όγκο 0,1lt. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο υπό συνθήκες ψύξης.

### 3.2. Προσδιορισμός της Αφλατοξίνης M1 στο γάλα

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αφλατοξίνης M1 στα δείγματα του γάλακτος πραγματοποιήθηκε με την Ανοσοενζυμική Μέθοδο ELISA, στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων, της Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Σε κάθε δείγμα γάλακτος για τον προσδιορισμό της αφλατοξίνης M1 χρησιμοποιήθηκε η τυποποιημένη δοκιμή Ridascreen Aflatoxin M1 του οίκου R-Biopharm και η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν αυτή που προτείνεται από τον κατασκευαστή. Καθώς οι αφλατοξίνες είναι ευαίσθητες στην παρουσία φωτός, η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες μειωμένης παρουσίας φωτός.

Για τη διευκόλυνση της παρουσίασης των αποτελεσμάτων, οι συγκεντρώσεις της αφλατοξίνης M1 στο γάλα χωρίστηκαν στις ακόλουθες 3 κατηγορίες:

- Συγκεντρώσεις <5 ppt, ή απουσία αφλατοξίνης M1
- Συγκεντρώσεις αφλατοξίνης M1, από 5 έως 50 ppt,
- Συγκεντρώσεις αφλατοξίνης M1, από 50 έως 80 ppt,

Στην παραπάνω κατηγοριοποίηση, το όριο των 50 ppt τέθηκε ως αντιπροσωπευτικό του ανώτατου αποδεκτού ορίου συγκέντρωσης αφλατοξίνης M1 στο γάλα, όπως ορίζεται από την Ευρωπαϊκή Ένωση και άρα ισχύει και στην Ελλάδα, ενώ τα 5 ppt και τα 80 ppt, είναι το κατώτατο και το ανώτατο όριο ανίχνευσης της M1 στην εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου, αντίστοιχα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρουσιάζονται στους Πίνακες 3 και 4. Εξετάστηκαν συνολικά 50 δείγματα πρόβειου και αίγειου γάλακτος και σε 34 από αυτά (68%) ανιχνεύθηκε η παρουσία αφλατοξίνης M1 (AFM1), ενώ σε 5 δείγματα (10%) η συγκέντρωση της AFM1 βρέθηκε μεγαλύτερη από 50 ng/kg, που αποτελεί το επίσημο αποδεκτό όριο στην Ε.Ε.

Αναλυτικά, εξετάστηκαν 35 δείγματα πρόβειου γάλακτος από τα οποία τα 27 (77,1%) βρέθηκαν θετικά στην παρουσία AFM1, ενώ 8 δείγματα (22,9%) βρέθηκαν αρνητικά για την αφλατοξίνη M1. Σε 5 από τα 35 δείγματα πρόβειου γάλακτος (14,3%) η συγκέντρωση της AFM1 ήταν μεγαλύτερη από 50 ng/kg.

Αντίστοιχα, στα 15 δείγματα αίγειου γάλακτος που εξετάστηκαν, 10 δείγματα (66,7%) βρέθηκαν θετικά στην παρουσία AFM1, ενώ 5 δείγματα (33,3%) βρέθηκαν αρνητικά για την αφλατοξίνη M1. Σε κανένα από τα 15 δείγματα αίγειου γάλακτος, η συγκέντρωση της AFM1 δεν ήταν μεγαλύτερη από 50 ng/kg.

**Πίνακας 3.** Παρουσία της αφλατοξίνης M1 σε νωπό πρόβειο και αίγειο γάλα στην περιοχή της Θεσσαλίας

Είδος γάλακτος	Αριθμός δειγμάτων	Θετικά στην παρουσία AFM1	Αρνητικά στην παρουσία AFM1
Πρόβειο	35	27 (77,1%)	8 (22,9%)
<u>Αίγειο</u>	15	10 (66,7%)	5 (33,3%)
Σύνολο	50	37 (74%)	13 (26,%)

**Πίνακας 4.** Συγκέντρωση της αφλατοξίνης M1 σε δείγματα νωπού πρόβειου και αίγειου γάλακτος στην περιοχή της Θεσσαλίας

Είδος γάλακτος	Αριθμός δειγμάτων	Συγκέντρωση AFM1	
		< 50 ng/kg	> 50 ng/kg
Πρόβειο	35	30 (85,7%)	5 (14,3%)
<u>Αίγειο</u>	15	15 (100%)	0 (0%)
Σύνολο	50	45 (90%)	5 (10%)

Όσον αφορά την παρουσία της AFM1 στο πρόβειο και αίγειο γάλα, ελάχιστες έρευνες έχουν δημοσιευτεί (Gonaris 2009). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα αναφέρονται παρόμοια αποτελέσματα με την παρούσα εργασία, αφού στο 73,3 και 66,7% των δειγμάτων πρόβειου και αίγειου γάλακτος αντίστοιχα, διαπιστώθηκε η παρουσία της τοξίνης (Roussi et al. 2001). Στην ίδια μελέτη παρουσιάζεται χαμηλότερο ποσοστό δειγμάτων με συγκεντρώσεις της αφλατοξίνης πάνω από 50 ng/l, αφού αναφέρεται ότι μόνο ένα δείγμα πρόβειου γάλακτος περιείχε 53 ng/l AFM1, πάνω από το όριο της Ε.Ε.

Ανάλογα αποτελέσματα σχετικά με την παρουσία της αφλατοξίνης M1 σε νωπό αίγειο γάλα, αναφέρονται από τους Ruangwises et al. 2013 σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ταϊλάνδη. Εξετάστηκαν 45 δείγματα νωπού γάλακτος και τα ποσοστά ανίχνευσης της AFM1 ήταν 46,7%, 66,7% και 60% για τα έτη 2009, 2010 και 2011, αντίστοιχα. Από τα δείγματα γάλακτος που αναλύθηκαν τα 8 (15,4%) βρέθηκαν με συγκέντρωση αφλατοξίνης μεγαλύτερη από 50 ng/l.

Σε αντίθεση με την παρούσα εργασία, αποτελέσματα υψηλού ποσοστού δειγμάτων νωπού αίγειου γάλακτος με συγκέντρωση της AFM1 πάνω από 50 ng/l αναφέρονται σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Τουρκία (Ozdemir 2007). Σε 110 δείγματα νωπού αίγειου γάλακτος που εξετάστηκαν βρέθηκε ότι το 6,36% των δειγμάτων περιείχαν αφλατοξίνη σε συγκέντρωση υψηλότερη από το επιτρεπόμενο όριο στην Ε.Ε. (50 ng/l).



Χαμηλότερα ποσοστά παρουσίας της AFM1 για το γάλα πρόβειο (37,3%) και αίγιο γάλα (27,1%) βρέθηκαν από τους Rahimi et al. (2010) σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Ιράν. Στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι τα ποσοστά παρουσίας της αφλατοξίνης σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 50 ng/l ήταν 3,9% και 5,7%, για το πρόβειο και αίγιο γάλα, αντίστοιχα. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός, ότι στη συγκεκριμένη περιοχή του Ιράν δε χρησιμοποιούνται συμπυκνωμένες ζωοτροφές ή καλαμπόκι που θεωρούνται ιδιαίτερα επιβαρυνμένες από μυκοτοξίνες (Rahimi et al. 2010).

Τα σχετικά υψηλά ποσοστά παρουσίας της AFM1 για το πρόβειο γάλα και αίγιο γάλα στην παρούσα εργασία μπορούν να αποδοθούν εν μέρει στο ότι η συλλογή των δειγμάτων έγινε κατά τη διάρκεια του χειμώνα, οπότε τα ζώα εκτρέφονται στεγασμένα, σε πεδινές και ημιορεινές περιοχές της Θεσσαλίας, με το σιτηρέσιο με το οποίο διατρέφονται, να απαρτίζεται από αυξημένο ποσοστό συμπυκνωμένων ζωοτροφών, οι οποίες και αποδίδουν την κατάλληλη ενέργεια για την κάλυψη των αυξημένων αναγκών συντήρησης της εποχής, λόγω της παρουσίας των χαμηλών θερμοκρασιών και της αυξημένης γαλακτοπαραγωγής. Επειδή οι συμπυκνωμένες αυτές ζωοτροφές έχουν συγκομιστεί την καλοκαιρινή περίοδο παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα να έχουν μολυνθεί με AFB1, ιδιαίτερα αν οι συνθήκες αποθήκευσής τους δεν είναι οι κατάλληλες.

Η ανάπτυξη των μυκήτων και η μόλυνση με αφλατοξίνες, είναι συνέπεια των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μυκήτων, των ξενιστών και του περιβάλλοντος. Ο κατάλληλος συνδυασμός αυτών των παραγόντων καθορίζει την προσβολή και την αποίκιση του υποστρώματος, καθώς και το είδος και την ποσότητα της αφλατοξίνης που παράγεται. Η ενεργότητα του νερού, η πίεση της αύξησης της θερμοκρασίας και η βλάβη του φυτού-ξενιστή από τα έντομα, είναι ιδιαίτερα καθοριστικοί παράγοντες για την προσβολή από μύκητες. Πρακτικά το ποσοστό των αφλατοξινών στα δημητριακά, καθορίζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η διαχείριση (αγρονομικές τεχνικές) και οι καιρικές-κλιματολογικές συνθήκες. Το 2012 ήταν έτος μεγάλης ξηρασίας για όλα τα Βαλκάνια, γεγονός που καταδεικνύει την καταλυτική επίδραση της κλιματικής αλλαγής στο βόρειο ημισφαίριο, που οδήγησε, αφενός μεν, σε δραματική μείωση της σοδειάς των δημητριακών (ιδιαίτερα στη Σερβία και τη Ρουμανία), αφετέρου, στην ανεξέλεγκτη διάδοση του μύκητα *Aspergillus spp*, και την υπερπαραγωγή της αφλατοξίνης B1. Τα μολυσμένα σιτηρά χρησιμοποιήθηκαν ως ζωοτροφή, με αποτέλεσμα να περάσει η αφλατοξίνη στο γάλα, με τη μορφή της

AFM1. Το 30% της περυσινής σοδειάς καλαμποκιού στη Σερβία είναι μολυσμένο και ακατάλληλο για την διατροφή ανθρώπων και ζώων, σύμφωνα με το Ινστιτούτο Τεχνολογίας Τροφίμων του Νόβισαντ, συνεπεία της μεγάλης ξηρασίας, με το 1/3 των δειγμάτων καλαμποκιού απ' όλη την χώρα, να είναι εκτός ορίων (σε ποσοστό 10-200%, σε σχέση με το ανώτατο επιτρεπόμενο όριο). Αντίστοιχα προβλήματα εμφανίστηκαν στις Η.Π.Α., όπου η ξηρασία του 2012 οδήγησε στην προσβολή του 50% της σοδειάς καλαμποκιού της πολιτείας του Μιζούρι. Το 2011 το αντίστοιχο ποσοστό ήταν μόλις 8%. Ανάλογη ήταν η εικόνα και στην Ελλάδα, ιδιαίτερα στις περισσότερο ξηροθερμικές περιοχές της (π.χ. Θεσσαλία), και πιο συγκεκριμένα, αν η παρατεταμένη ξηρασία είχε συνδυαστεί με υψηλά ποσοστά βροχοπτώσεων κατά το στάδιο της άνθησης.

Τέλος, φαίνεται ότι εξαιτίας της βαθύτατης οικονομικής κρίσης που μαστίζει τη χώρα μας, πολλοί παραγωγοί στην προσπάθειά τους να μειώσουν το κόστος παραγωγής δεν εφαρμόσαν πιστά τους Κανόνες Ορθής Γεωργικής Πρακτικής, καθώς δεν συγκόμισαν το καλαμπόκι στην κατάλληλη εποχή με επίπεδα υγρασίας (<18%) και δεν υπέβαλλαν το προϊόν τους στη διαδικασία της ξήρανσης, αμέσως μετά τον θερισμό και πριν την αποθήκευσή του. Τέλος δεν τηρήθηκαν σε πολλές περιπτώσεις οι Κανόνες Υγιεινής στους χώρους αποθήκευσης, που προβλέπουν καλό αερισμό και θερμοκρασία μικρότερη των 15ο C.

Από τα παραπάνω είναι φανερό η ανάγκη συγκρότησης, από μέρους των γεωργών, Ολοκληρωμένου Σχεδίου Ελέγχου της Καλλιέργειάς τους (Crop Monitor Project), που θα περιλαμβάνει όλα τα ενδεδειγμένα κύρια και δευτερεύοντα μέτρα δράσης, με σκοπό την πρόληψη ανάπτυξης μολύνσεων από μυκοτοξίνες. Γενικά, θα πρέπει να απομακρύνονται και να καταστρέφονται πηγές μόλυνσης, όπως ζιζάνια, γεωργικά υπολείμματα, ή βρώμικα γεωργικά υλικά (Codex Alimentarius Commission, 2003, FAO/WHO/UNEP, 1999a).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η παρουσία της αφλατοξίνης M1 σε νοπό πρόβειο και αίγιο γάλα από εκτροφές μικρής και μεσαίας δυναμικότητας στην περιοχή της Θεσσαλίας. Η ανάλυση των δειγμάτων έδειξε παρουσία της AFM1 στο 77,1% και 66,7% για το πρόβειο και αίγιο γάλα, αντίστοιχα. Μάλιστα σε 5 δείγματα πρόβειου γάλακτος βρέθηκε συγκέντρωση της M1 μεγαλύτερη από το όριο των 50 ng/kg στην Ε.Ε.

Τα ποσοστά της παρουσίας της AFM1 στο πρόβειο και αίγιο γάλα είναι ανάλογα με προηγούμενες αντίστοιχες μελέτες στην Ελλάδα, αλλά και διεθνώς. Η παρουσία της AFM1 με τις σημαντικές επιπτώσεις που αυτή μπορεί να επιφέρει στην υγεία των καταναλωτών δείχνει την ανάγκη για διαρκή επιτήρηση και έλεγχο τόσο στην πρωτογενή παραγωγή, τη βιομηχανία γάλακτος όσο και στο επίπεδο των τελικών προϊόντων. Η σημασία των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας ενισχύεται από το γεγονός ότι η μεγαλύτερη ποσότητα πρόβειου και αίγιου γάλακτος που παράγεται στην Ελλάδα χρησιμοποιείται τελικά για την παραγωγή τυριών.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **ΕΛΛΗΝΙΚΗ**

**Ανυφαντάκης, Ε.Μ.** (1986) Τυροκοκομία, Εκδ. Καραμπερόπουλος Α.Ε., Αθήνα.

**Αποστολόπουλος Ν.** (2011) Μελέτη της επίδρασης των φυσικοχημικών παραμέτρων ανάπτυξης της μυκοτοξίνης Ζεαραλενόνης (ZON) σε δημητριακά, Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Διπλωματική Εργασία, Πάτρα.

**Αλεξόπουλος Κ.** (1997) Μυκοτοξικώσεις: «Η πραγματική διάσταση του προβλήματος στη σύγχρονη χοιροτροφία». Σύγχρονη χοιροτροφία, 4: 29-33.

**Βακάκης Φ.** (2007) Αιγοπροβατοτροφία, Βασική Παραγωγική Δραστηριότητα για την Αειφόρο Ανάπτυξη του Αγροτικού Χώρου, Aigoprovatotrofia\_05\_07\_text.doc, Αθήνα.

**Βάσσος, Δ.Β.** (2004) Τρόφιμα και υγεία του καταναλωτή (Τροφογενείς διαταραχές), Εκδόσεις Παπασωτηρίου, σελ. 131-136.

**Γεωργαλά Α., Καραλή Φ., Μοάτσου Γκ. και Καμιναρίδης Στ.** (2009) Η παρουσία της αφλατοξίνης M1 στα τυριά, Εθνική Επιτροπή Γάλακτος Ελλάδας (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών), 1:26-41.

**Γεωργιάδη Μ.,** (2009) Μελέτη του προβλήματος των αφλατοξινών σε κελυφωτά φυστίκια, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Μεταπτυχιακή Ερευνητική Εργασία, Αθήνα,

**Εγχειρίδιο Τμήματος Αιγοπροβατοτροφίας του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων,** Αθήνα (2006)

**Ελληνικός Οργανισμός Γάλακτος και Κρέατος,** ΕΛΟΓΑΚ, (2012)

**Θεοφυλάκτου Χριστοφορίδου Σ.** (2011) Αξιολόγηση εμπορικών συσκευασιών της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA ως προς την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση αφλατοξίνης M1 σε γάλα μέσω της συγκριτικής αξιολόγησης παραμέτρων, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, Μεταπτυχιακή Ερευνητική Εργασία, Λάρισα

**Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006** της Επιτροπής της 19ης Δεκεμβρίου 2006 «για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα». Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, L 364/15.

**Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 401/2006** της Επιτροπής της 23ης Φεβρουαρίου για καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα».

**Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 165/2010** της Επιτροπής της 26ης Φεβρουαρίου 2010 για την τροποποίηση του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 για τον «καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα αναφορικά με τις αφλατοξίνες».

**Κουρουσέκος Γ.** (2008) Διερεύνηση των επιπτώσεων από τη χορήγηση αφλατοξίνης B1 στη χημική σύνθεση του γάλακτος και σε αναπαραγωγικές παραμέτρους της εγχώριας ποιμενικής αίγας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Κτηνιατρική Σχολή, Διδακτορική Διατριβή, Θεσσαλονίκη.

**Κουρουσέκος Γ.Δ., Μπελιμπασάκη Σ., Σαράτσης Φ., Λυμπερόπουλος Α., Μπόσκος Κ.** (2006) Παρουσία της αφλατοξίνης M1 στο νωπό γάλα αγελάδων γαλακτοπαραγωγής στην ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλονίκης». 10ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 40.

**Λιόλιου Ε.** (2009) Μελέτη της επίδρασης ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων στη συγκέντρωση ωχρατοξίνης A σε εργαστηριακά θρεπτικά υποστρώματα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Π.Μ.Σ. Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου, Μεταπτυχιακή μελέτη, Αθήνα.

**Μάντης Α.** (1993) Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. Θεσσαλονίκη.

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

## ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

**Applebaum R.S., Brackett R.E., Wiseman D.W., Marth E.H.** (1982) Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: feed intake and yield, toxin content, and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxin". *J Dairy Sci*, 65: 1503-1508.

**Applebaum, R.S., Marth, E.H.** (1982) Fate of aflatoxin M1 in cottage cheese, *J Food Prot* 45: 903-904.

**Applebaum R.S., Marth E.H.** (1983) Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: Concentration of blood serum constituents and hormones associated with liver-kidney dysfunction and maintenance of lactation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 18: 381-386.

**Barbiroli A., Bonomi F., Benedetti S., Mannino S., Monti L., Cattaneo T. and Lametti S.** (2007) Binding of aflatoxin M1 to different protein fractions in ovine and caprine milk. *J Dairy Sci*, 90: 532-540.

**Battacone G., Nudda A., Cannas A., Cappio Borlino A., Bomboi G., Pulina G.** (2003) Excretion of aflatoxin M1 in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B1. *J Dairy Sci*, 86: 2667-2675.

**Battacone G., Nudda A., Palomba M., Pascale M., Nicolussi P., Pulina G.** (2005) Transfer of Aflatoxin B1 from Feed to Milk and from Milk to Curd and Whey in Dairy Sheep Fed Artificially Contaminated Concentrates. *J Dairy Sci*, 88: 3063-3069.

**Bennett J.W., Bentley R.** (1999) Pride and prejudice: The story of ergot. *Perspect. Biol. Med.* 42:333-355.

**Bennett J.W., Klich M.** (2003) Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev.* 16:497-516.

**Bellioni-Businco, B., Paganelli, R., Lucenti, P., Giampietro, P.G., Perborn, H., Businco, L.** (1999) Allergenicity of goat's milk in children with cow's milk allergy, *J Allergy and Clinical Immu*, 103 (6): 1191-1194.

**Biancardi A.** (1997) Determination of aflatoxin M1 residues in milk, a comparative assessment of ELISA and IAC-HPLC Methods, *Industrie Alimentari*, 36(361): 870-876.

**Blankenship L.T., Dickey J.F., Bodine A.B.** (1982) In vitro mycotoxin binding to bovine uterine steroid hormone receptors. *Theriogenology*, 17: 325-329.

**Brackett, R.F., Marth, E.H.** (1982) Fate of aflatoxin M1 in Parmesan and Mozzarella cheese. *J Food Prot*, 45: 597-600.

**Brown R.W., Pier A.C., Richard J.L., Krogstad R.E.** (1981) Effects of dietary aflatoxins on existing bacterial intramammary infections of dairy cows. *Am J Vet Res*, 42: 927-933.

**Carvajal M., Rojo F., Mendez I., Bolanos A.** (2003 $\beta$ ) Aflatoxin B1 and its interconverting metabolite aflatoxicol in milk: the situation in Mexico. *Food Addit Contam*, 20: 1077-1086.

**Cathey C.G., Nuang Z.G., Sarr A.B., Clement B.A., Phillips, T.D.** (1994) Development and evaluation of a minicolumn assay for the detection of aflatoxin M1 in milk. *J Dairy Sci*, 77, 1223-1231.

**Charmley E., Trenholm H.L., Thompson B.K., Vudathala D., Nicholson J.W., Prelusky D.B., Charmley L.L.** (1993) Influence of level of deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production, and its composition. *J Dairy Sci*.76:3580-3587.

**Celik T.H., Sarimehmetoglu B., Kuplulu O.** (2005) Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk, *Veterinarski Arhiv.*, 75(1): 57-65.

**Cigic I.K., Prosen H.** (2009) An Overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins, *International Journal of Molecular Sciences*, 10(1): 62-115.

**Crowther J.** (2001), *The ELISA Guidebook*, HUMANA PRESS Inc., pp. 9-22.

**Codex Alimentarius Commission** (2001) Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M1 in milk. Codex Committee on food additives and contaminants. 33rd session, Hague, Netherlands.

**Col, R.J., Cox R.H.** (1981) *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. Academic Press, New York.

**Commission Regulation (EC)** (2006b) No 1881/2006: of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of European Union*, L 364, pp. 5-24.

**Creppy EE** (1999) Human ochratoxicosis. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 18:277-293.

**Creppy E.E., Baudrimont I., Betbeder A.M.** (1995) Prevention of nephrotoxicity of ochratoxin A, a food contaminant. *Toxicol Lett*, 83: 869-877.

**Creppy E.E.** (2002) Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett*, 127: 19-28.

**Diaz D.E.** (2002) Unravelling the mystery of mycotoxins: novel solutions to counteract them. In: *Harnessing Nature, Practical Applications of Natural Technologies*, Proceedings 107 from Alltech's 17th European, Middle Eastern and African Lecture Tour, pp 10-18.

**Diaz D.E., Hagler W. M.Jr, Blackwelder J.T., Eve J.A., Hopkins B.A., Anderson K.L., Jones F.T., Whitlow L.W.** (2004) Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed *Mycopathologia*, 157 (2): 233-241.

**Diekman M.A., Green M.L.** (1992) Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J Anim Sci.* 70, 1615-1627.

**Dragacci S., Gleizes E., Fremi J.M., Candlish A.A.G.** (1995) Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M1 in cheeses, *Food Additives & Contaminants*, 12(1):59-65.

**Dutton M.F.** (1996) Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects. *Pharmacol Ther*, 70: 137-161.

**Eaton D.L., Groopman, J.D.** (1994) *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*, Academic Press, pp. 45-72

**El-Nezami H.S., Nicoletti G., Neal G.E., Donohue D.C., Ahokas J.T.** (1995) Aflatoxin M1 in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. *Food Chem Toxicol*, 33: 173-179.

**Fernandez A., Belio R., Ramos J.J., Sanz M.C., Saez T.** (1997) Aflatoxins and their metabolites in the tissues, faeces and urine from lambs feeding on an aflatoxin-contaminated diet. *J Sci Food Agric*, 74: 161-168.

**Fink-Gremmels J.** (1999) Mycotoxins: their implications for human and animal Health. *Vet. Q.* 21, 115-120.

**Fink-Gremmels J.** (2008) Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk, A review. *Food Addit Contam*, 25: 172-180.

**Frobish R.A., Bradley D.D., Wagner D.D., Long-Bradley P.E., Hairston H.** (1986) Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *J Food Prot*, 49: 781-785.



**Galvano F., Galofaro V., Galvano G.** (1996) Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: a worldwide review. *J Food Prot*, 59: 1079-1090.

**Galvano F., Galofaro V., Ritieni A., Bognanno M., De Angelis A., Galvano G.**, (2001) Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy in dairy products marketed in Italy: second year of observation. *Food Addit Contam*, 18: 644-646.

**Gelderblom W.C., Jaskiewicz K., Marasas W.F., Thiel P.G., Horak R.M., Vleggaar R., Kriek N.P.** (1988) Fumonisin--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol*. 54:1806-1811.

**Govaris A., Roussi V., Koidis P.A., Botsoglou N.A.** (2002) Distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt. *Food Addit Contam*, 19: 1043-1050.

**Govaris A., Roussi V., Koidis P.A., Botsoglou N.A.** (2001) Distribution and stability of aflatoxin M1 during processing, ripening and storage of Telemes cheese. *Food Addit Contam*, 18: 437-443.

**Govaris A.** (2009) Aflatoxins in foods of animal origin, *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 60(4): 534-543.

**Grant, D.W., Carlson, F.W.** (1971) Partitioning behavior of aflatoxin M1 in dairy products. *Bulletin of the Environmental Contamination and Toxicology*, 6:521-524

**Guan, D., Peiwu, L., Cui, Y., Zhang, Q., Zhang, W.** (2011) A competitive immunoassay with a surrogate calibrator curve for aflatoxin M1 in milk, *Analytica Chimica Acta*, 703: 64-69

**Guerre P., Galtier P., Burgat V.** (1996) Le métabolisme: Un facteur de susceptibilité à la toxicité des aflatoxines. *Rev Med Vet*, 147: 879-892.

**Gupta R.C.** (2007) *Veterinary toxicology: basic and clinical principles*, Elsevier Inc, pp. 939-947

**Haenlein G.F.W.**, (2004) Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51:155-163

**Hafez E.S.E.** (1987) Semen evaluation. In: *Reproduction in farm animals*. Ed. Hafez ESE, Lea & Febiger, Philadelphia, pp 457-461.

**Hafez A.H., Megalla S.E., Mohran M.A., Nassar A.Y.** (1985) Aflatoxin and aflatoxicosis: V. The kinetic behavior of dietary aflatoxins in colostrums drawn from cows postpartum. *Mycopathologia*, 89: 161-164.

**Hafez A.H., Megalla S.E., Mahmed A.A.** (1982) Aflatoxin and aflatoxicosis. III. Effect of dietary aflatoxin on the morphology of buffalo bull spermatozoa. *Mycopathologia*, 77: 141- 144.

**Harris B.J., Staples C.R.** (1992) The problems of mycotoxins in dairy cattle rations. Institute of Food and Agricultural Sciences, Cooperative Extension Service, University of Florida, [www.edis.ifas.ufl.edu/BODY\\_DS152](http://www.edis.ifas.ufl.edu/BODY_DS152).

**Harvey R.B., Kubena L.F., Huff W.E., Corrier D.E., Rottinghaus G.E., Phillips T.D.** (1990) Effects of treatment of growing swine with aflatoxin and T2 toxin. *Am J Vet Res*, 51: 1688-1693.

**Helferich W.G., Baldwin R.L., Hsieh D.P.** (1986) 14C-aflatoxin B1 metabolism in lactating goats and rats. *J Anim Sci*, 62: 697-705.

**Hendrickse R.G., Coulter J.B.S., Lamplugh, S.M.** (1982) Aflatoxin and Kwashiorkor: A study in Sudanese children, *British Medical Journal*, 285(6345):843-846

**Huff W.E., Kubena L.F., Harvey R.B., Doerr J.A.** (1988) Mycotoxin interactions in poultry and swine. *J Anim Sci*. 66 :2351-2355.

**Hui Y.H., Smith R.A., Spoerke D.G.** (2001) *Foodborne Disease. Handbook 2nd edition Revised and Expanded*, Marcel Dekker Inc, pp. 472-474

**International Agency for Research on Cancer (IARC)** (1993 $\beta$ ) Toxins derived from *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. crookwellense*: zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol and fusarenone X. In: *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*, IARC, Lyon, 56: 397-444.

**Ioannou-Kakouri E., Aletrari M., Christou E., Hadjioannou-Ralli A., Koliou A., Akkelidou D.** (1999) Surveillance and control of aflatoxins B1, B2, G1, G2, and M1 in foodstuffs in the Republic of Cyprus: 1992-1996. *J AOAC Int*, 82: 883-892.

**Izquierdo A.C., Mendoza R.M., Betancourt S.P., Gutierrez, J.F.P., Oaxaca, J.A.S.** , (2005) IDENTIFICATION OF M1 AFLATOXIN IN MILK ISAH, 2:380-382.

**Jay, M.J.**, (1996) Modern food microbiology 5th edition, Chapman & hall, pp. 595-596.

**Jacobsen B.J., Bowen K.L., Shedly R.A., Diener U.L., Kemppainen B.W., Floyd J.** (1993) Mycotoxins and Mycotoxicoses. Alabama A & M and Auburn Universities, [www.aces.edu/department/grain/ANR767.htm](http://www.aces.edu/department/grain/ANR767.htm).

**JECFA** (2000) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 53rd Report: Safety evaluation of certain food additives. WHO Food Additives Series 44.

**Kalantzopoulos G.C.** (1993) Cheeses from ewe's and goat's milk. In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, 2nd ed., Fox P.F., London, Chapman & Hall. pp 507-533.

**Kaniou-Grigoriadou I., Eleftheriadou A., Mouratidou T., Katikou P., March** (2005) Determination of Aflatoxin M1 in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese, Food Control, 16(3):257-261

**Kiermeier F., Mashaley R.** (1977) Einfluss der molkereitechnischen be handlung der rohmich auf des aflatoxin M1 gehalt der daraus hergestellten Produkte. Zeitschrift fur Lebensmitteluntersuchung undforschung, 164, 183-187.

**King B.** (1979) An outbreak of ergotism in Wollo, Ethiopia. Lancet 1:1411.

**Krogh P.** (1992) Role of ochratoxin in disease causation. Food Chem Toxicol, 30: 213-224.

**Kuilman M.E., Maas R.F., Woutersen-van Nijnanten F.M., Fink-Gremmels J.**, (2000) Inhibition of aflatoxin M1 production by bovine hepatocytes after intervention with oltipraz. Vet Q, 22: 30-35.

**Kumagai S.** (1989) Intestinal absorption and excretion of aflatoxin in rats, Toxicology and Applied Pharmacology, 97(1):88-97

**Labbe R.G., Garcia, S.** (2001)  $\gamma$ uide to foodborne pathogens, John Wiley and Sons Inc, pp. 41-45.

**Lorenz K.** (1979) Ergot on cereal grains. CRC Crit Rev Food Sci Nutr. 11:311-354.

**Manabe M.** (2001) Fermented foods and mycotoxins. Mycotoxins. 51:25-28.

**Martins M.L., Martins H.M.** (2004) Aflatoxin M1 in yoghurts in Portugal. *Int J Food Microbiol*, 91: 315-317.

**Montagna M.T., Napoli C., De Giglio O., Iatta R., Barbuti, G.** (2008) Occurrence of Aflatoxin M1 in Dairy Products in Southern Italy, *International Journal of Molecular Sciences*, 9(12):2614-2621.

**Moss, M.O.** (1989) Mycotoxins of *Aspergillus* and other filamentous fungi. *Journal of Applied Bacteriology Symp Suppl.*, 69S-81S.

**Newell, J.** (1983) Treatment for Starvation may kill, *New Scientist Magazine*, p. 471.

**Nielsen, S.S.** (1998) *Food Analysis 2nd Edition*, Aspen Publishers Inc., pp. 317-318.

**Norred W.P., Voss K.A., Riley R.T., Plattner R.D.** (1996) Fumonisin toxicity and metabolism studies in the USDA. Fumonisin toxicity and metabolism. *Adv Exp Med Biol*, 392: 225-236.

**Oswailer G.D., Trampel D.W.** (1985) Aflatoxicosis in feedlot cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 187: 636-637.

**Oswailer G.D.** (1986) Occurrence and clinical manifestations of tricothecene toxicoses and zearalenone toxicoses. In: Richards JL, Thurston JR (Eds.) *Diagnosis of Mycotoxicoses*, 1st Edition. Martins Nijhoff, Dordrecht, pp 31-50.

**Oswailer, G.** (2005) AFLATOXINS and ANIMAL HEALTH, Iowa State University, pp. 1-4.

**Ozdemir M.** (2007) Determination of aflatoxin M1 levels in goat milk consumed in Kilis province. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 54: 99-103.

**Pandya A.J., Ghodke K.M.,** (2007) Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt, *Small Ruminant Research*, 68(1): 193-206

**Payne G.A., Brown M.P.** (1998) GENETICS AND PHYSIOLOGY OF AFLATOXIN BIOSYNTHESIS, *Annual Reviews*, 36: 329-362

**Patterson D.S.P., Glancy E.M., Roberts B.A.** (1980) The carryover of AFM1 in to the milk of cows fed ration containing a low concentration of AFB1. *Food Cosmet Toxicol*, 18: 35-37.

**Patterson R. & Young L.G.** (1992) Using NovasilR to alleviate the effects of vomitoxin in moldy corn diets. Ontario Swine Research Review, O. A. C. Publication, No 0292: 18.

**Pier A.C.** (1992) Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. J Anim Sci, 70: 3964-3967.

**Pierides M., El-Nezami H., Peltonen K., Salminen S., Ahokas J.** (2000) Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M1 in a food model. J Food Prot, 63: 645-650.

**Polan C.E., Hayes J.R. and Campbell T.C.** (1974) Consumption and fate of aflatoxin B1 by lactating cows. J Agric Food Chem, 22: 635-638.

**Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M. & Piva, G.,** (2009) On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. Food and Chemical Toxicology, 47 (5): 984-991

**Rahimi, E.** (2010) A Study on Contamination of Aflatoxin M1 in Milk and Infant Milk Products in Iran, American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences, 2(2):109-111

**Rahimi E., Bonyadian M., Rafei M., Kazemeini H.R.** (2010) Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. Food Chem Toxicol. 48:129-131.

**Rheeder J.P., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Sydenham E.W., Shephard G.S., Van Schalkwyk D.J.**(1992) Fusarium moniliforme and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. Phytopathology, 82: 353-357.

**Richard J.L., Meerdink G., Maragos C.M., Tumbleson M., Bordson G., Rice L.G., Ross P.F.** (1996) Absence of detectable fumonisins in the milk of cows fed fusarium proliferatum (Matsushima) Nirenberg culture material. Mycopathologia, 133: 123-126.

**Rosi, P., Borsari, A., Lasi, G., Lodi, S., Galanti, A., Fava, A., Girotti & S., Ferri, E.,** (2007) Aflatoxin M1 in milk: Reliability of the immunoenzymatic assay, International Dairy Journal, 17(5):429-435

**Ruangwises S., Saipan P., Ruangwises N.** (2013) Occurrence of Aflatoxin M1 in Raw and Pasteurized Goat Milk in Thailand. In "Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospect", Eds Mehdi Razzaghi-Abyaneh.

**Roussi V, Govaris A, Varagouli A, Botsoglou NA**, (2002) Occurrence of aflatoxin M1 in raw and market milk commercialized in Greece. *Food Addit Contam*, 19: 863-868.

**Scott P.M.**, (1984) Effect of food processing on mycotoxins. *J Food Prot*, 47: 489-499.

**Scot, P.M.**, (1989) Mycotoxigenic fungal contaminants of cheese and other dairy products. In Van Egmond HP (ed). *Mycotoxins in dairy products*, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 193-259.

**Scott P.M.**, (1991) Possibilities of reduction or elimination of mycotoxins present in cereal grains. In: "Cereal grains - mycotoxins, fungi and quality in drying and storage" (Ed J Chelkowski) Elsevier, Amsterdam, pp 529-572.

**Smith, J.E. & Anderson, R.A.**, (1991) *Mycotoxins and Animal Foods*, CRS Press, pp.37-56

**Smith EE, Kubena LF, Braithwaite CE, Harvey RB, Phillips TD, Reine AH**, (1992) Toxicological evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid in broiler chickens. *Poult Sci*. 71:1136-1144.

**Smith E.E., Phillips T.D., Ellis J.A., Harvey R.B., Kubena L.F., Thompson J., Newton G.** (1994) Dietary hydrated sodium calcium aluminosilicate reduction of aflatoxin M1 residue in dairy goat milk and effects on milk production and components. *J Anim Sci*, 72: 677-682.

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

**Stubblefield, R.D., van Egmond, H.P., Paulsch, W.E. & Schuller, P.L.** (1980) Determination and confirmation of identity of aflatoxin M1 in dairy products: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 63 (4), 907-921.

**Stubblefield R.D., Pier A.C., Richard JL, Shotwell O.L.**, (1983) Fate of aflatoxins in tissues, fluids, and excrements from cows dosed orally with aflatoxin B1. *Am J Vet Res*, 44: 1750-1752.

**Tajik, H., Rohani, S.M.& Moradi, M.**, (2007) Detection of aflatoxin M1 in raw and commercial pasteurized milk in Urmia, Iran, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(22):4103-4107

**Teren J., Varga J., Hamari Z., Rinyu E., Kevei F.** (1996) Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*. 134:171-176.

**Van de Merwe K.J., Steyne P.S., Fourie L.F., Scott D.B., Theron J.J.** (1965) Ochratoxin A, a toxin metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. *Wilh. Nature*. 205:1112-1113.

**Van Egmond H.P.** (1989) Aflatoxin M1: occurrence, toxicity, regulation. In HP Van Egmond (Ed.) *Mycotoxins in dairy products*. Elsevier Applied Science, London. p11-55.

**Veldman A.J., Meijs A.C., Borggreve G.J., Heeresvan der Tol J.J.** (1992) Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. *Anim Prod*, 55:163-168.

**Virdis, S., Corgiolu, G., Scarano, C., Pilo, A.L. & De Santis, E.P.L.** (2008) Occurrence of Aflatoxin M1 in tank bulk goat milk and ripened goat cheese. *Food Control*, 19, 44-49.

**Weaver G.A., Kurtz H.J., Mirocha C.J., Bates F.Y., Behrens J.C., Robison T.S., Swanson S.P.** (1980) The failure of T2 mycotoxin to produce hemorrhaging in dairy cattle. *Can Vet J*, 21: 210-213.

**Weidenborner, M.**, (2001) *Encyclopedia of Food Mycotoxins*, Springer-Verlag, pp. 16

**Whitlow L.W., Nebel R.L., Hagler W.M.J** (1994) The association of deoxynivalenol in grain with milk production loss in dairy cattle. In, *Biodeterioration Research 4: M 134 Mycotoxins, Wood Decay, Plant Stress, Biocorrosion and General Biodeterioration*, C.E.O'Rear, Ed., Plenum Press, New York. Pp 131-139.

**World Health Organization (WHO), Food Additives Series No. 40** (1998) Safety evaluation of certain food additives and contaminants. The forty-ninth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, (JECFA), Geneva.

**WHO & U.S. C.D.C.**, (2005) *Public Health Strategies for Preventing Aflatoxin Exposure*, p.6

**Wang, H., Zhou, X. J., Liu, Y.Q., Yang, H.M. & Guo, Q.L.** (2010) Determination of aflatoxin M1 in milk by triple quadrupole liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Additives & Contaminants*, 27(9): 1261-1265

**Wu JT, Chiang KC, Cheng FP, (2006)** Expression of progesterone receptor(s) during capacitation and incidence of acrosome reaction induced by progesterone and zona proteins in boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 93:34-45.

**Yousef, A.E. & Marth, E.H. (1989)** Stability and degradation of aflatoxin M1. In van Egmond, H.P. (Ed.), *Mycotoxins in dairy products.* Elsevier Applied Science, London and New York, pp. 127-161.

**Zheng, M.Z., Richard, J.L. & Binder J. (2006)** A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins, *MYCOPATHOLOGIA*, 161(5):261-273