

Ispitivanje uzoraka mlijeka na prisutnost mikotoksina

Kevrić, Antonija

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:178698>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Antonija Kevrić

ISPITIVANJE UZORAKA MLIJEKA NA PRISUTNOST MIKOTOKSINA

Završni rad

Rijeka, 2024

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Antonija Kevrić

ISPITIVANJE UZORAKA MLIJEKA NA PRISUTNOST MIKOTOKSINA

Završni rad

Rijeka, 2024

SAŽETAK

Mlijeko je ključan izvor životinjskih proteina i esencijalnih hranjivih tvari, posebice za djecu. Kontaminacija mlijeka mikotoksinima, toksinima koje proizvode plijesni, može značajno ugroziti njegovu kvalitetu i sigurnost. Mikotoksini, prisutni u hrani, određeni su rizik za ljude i životinje zbog mogućnosti uzrokovanja bolesti poput raka i imunosupresije. Aflatoksin uglavnom proizvode plijesni *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. Hidroksilirani metaboliti aflatoksina B1 i B2, poznati kao M1 i M2, mogu se pronaći u mlijeku i mliječnim proizvodima stoke koja je konzumirala kontaminiranu hranu. Cilj ovog istraživanja je ispitati prisutnost aflatoksina M1 u uzorcima mlijeka koristeći test AflaSensor nova. Test omogućuje analizu bez složene pripreme uzorka i pruža rezultate u desetak minuta. Rezultati su pokazali da AflaSensor nova učinkovito identificira aflatoksin M1 u uzorcima mlijeka, što omogućuje pravovremeno djelovanje i očuvanje visoke kvalitete mliječnih proizvoda. Dobiveni rezultati pokazuju da ispitana komercijalno dostupna mlijeka te domaća sirova mlijeka sadrže prihvatljivu količinu aflatoksina M1 te su u skladu s propisima Europske unije. Samo jedan ispitani uzorak mlijeka nije prikladan konzumaciji dojenčadi obzirom na propisane dopuštene količine aflatoksina M1 u mlijeku za dojenčad. Ova metoda osigurava pravilan nadzor nad sirovim mlijekom, tijekom prerade te u konačnoj kontroli mliječnih proizvoda, čime se štiti zdravlje potrošača i održava sigurnost na tržištu.

Ključne riječi: mlijeko, mikotoksini, aflatoksin, AflaSensor nova

SUMMARY

Milk is a key source of animal protein and essential nutrients, especially for children. Contamination of milk with mycotoxins, toxins produced by molds, can significantly threaten its quality and safety. Mycotoxins, present in food, are a certain risk for humans and animals due to the possibility of causing diseases such as cancer and immunosuppression. Aflatoxin is mainly produced by the molds *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Hydroxylated metabolites of aflatoxin B1 and B2, known as M1 and M2, can be found in milk and milk products from livestock that have consumed contaminated feed. The aim of this research is to examine the presence of aflatoxin M1 in milk samples using the AflaSensor nova test. The test enables analysis without complex sample preparation and provides results in ten minutes. The results showed that AflaSensor nova effectively identifies aflatoxin M1 in milk samples, which enables timely action and preservation of high quality dairy products. The obtained results show that the tested commercially available milk and domestic raw milk contain an acceptable amount of aflatoxin M1 and are in accordance with the regulations of the European Union. Only one tested sample of milk is not suitable for consumption by infants considering the prescribed permitted amounts of aflatoxin M1 in milk for infants. This method ensures proper supervision of raw milk, during processing and in the final control of dairy products, which protects the health of consumers and maintains safety on the market.

Keywords: milk, mycotoxins, aflatoxin, AflaSensor nova

Mentor rada: prof. dr. sc. Marina Šantić

Komentor rada: dr.sc. Ina Viduka

Završni rad obranjen je dana 16.09.2024. na Sveučilištu u Rijeci, Medicinski fakultet,

pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. Prof. dr. sc. Dijana Detel (predsjednica komisije)
2. Doc. dr. sc. Mirna Mihelčić
3. Prof. dr. sc. Marina Šantić
4. Dr. sc. Ina Viduka

Rad ima 37 stranica, 10 slika, 4 tablice, 34 literaturnih navoda.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Mikotoksini	1
1.1.1. Okratoksini	2
1.1.2. Zearalenon	3
1.1.3. Trihoteceni	4
1.1.4. Patulin	5
1.1.5. Aflatoksini	6
1.2. Mikotoksikoze	10
1.2.1. Aflatoksikoza	10
1.2.2. Interakcija HBV i aflatoksina u patogenezi hepatocelularnog karcinoma	11
1.3. Faktori okoliša koji utječu na rast plijesni i proizvodnju aflatoksina	11
1.4. Plijesni i mikotoksini u krmivu	12
1.4.1. Biomonitoring usjeva	13
1.5. Mikotoksini u kravljem mlijeku	13
1.6. Ispitivanje sirovog mlijeka	13
1.6.1. Brzi kvantitativni test – AflaSensor	14
2. CILJ RADA	17
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. Uzorci kravljeg mlijeka	18
3.2. Određivanje prisutnosti aflatoksina u uzorcima mlijeka - AflaSensor nova UNISENSOR	19
3.3 Interpretacija rezultata	20
4. REZULTATI	22
4.1. Količina aflatoksina M1 u uzorcima komercijalnih mlijeka	22
4.2. Količina aflatoksina M1 u uzorcima domaćih sirovih mlijeka	22
5. RASPRAVA	24
6. ZAKLJUČAK	27
7. LITERATURA	28
ŽIVOTOPIS	32

1. UVOD

1.1. Mikotoksini

Mikotoksini su prirodno prisutni toksini koje proizvode određene plijesni (gljive) te se mogu pronaći u hrani. To su stabilni kemijski spojevi različitih struktura i bioloških učinka. Uglavnom su bezbojni i bez okusa te u malim količinama mogu biti otrovni za ljude i životinje.

Plijesni rastu na različitim usjevima i prehrambenim proizvodima. Mikotoksini se pojavljuju u prehrambenom lancu kao rezultat infekcije usjeva plijesni. Mikotoksini su pronađeni u sljedećim žitaricama: pšenici, raži, ječmu, zobi, kukuruzu, riži i soji. Osim u žitaricama, moguće ih je pronaći u uljaricama, kavi, začinima, mlijeku, alkoholnim pićima, mesu, kobasicama, suhom i svježem voću, sijenu, brašnu te kruhu. Rast plijesni odvija se prije ili nakon žetve, za vrijeme skladištenja, u samoj hrani, a tome pogoduju topli i vlažni uvjeti. Mikotoksini nastaju i prilikom konzerviranja, za vrijeme sušenja i prerade (1).

Neke od plijesni koje stvaraju mikotoksine su *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* te *Alternaria*. Najčešći mikotoksini koje pronalazimo u hrani i pićima su aflatoksini, okratoksini, zearalenon, trihoteceni i patulin.

Izloženost mikotoksinima može se dogoditi izravno konzumacijom zaražene hrane ili neizravno od životinja koje su hranjene kontaminiranom stočnom hranom, osobito putem mlijeka. Visok rizik povezan s mikotoksinima proizlazi iz njihove otpornosti na visoke temperature tijekom kuhanja te se korištenjem uobičajenih postupaka obrade hrane oni ne mogu ukloniti.

Na razvoj plijesni u hrani utječu razni okolišni čimbenici, vrsta supstrata i dostupnost hranjivih tvari, postotak vlage u supstratu i okolini, zrelost kolonije, prisutnost ostalih plijesni, konkurencija s ostalim mikroorganizmima te oštećenje supstrata uzrokovano insektima. Postupci uzgoja usjeva i sadašnji klimatski uvjeti također imaju utjecaj na pojavu različitih štetnih čimbenika, posebice insekata, koji oštećenjem usjeva mogu uzrokovati kontaminaciju plijesnima i mikotoksinima. Povišene razine ugljičnog dioksida, porast temperature okoliša i izmjena ekstremnih suša s ekstremnim kišama, imaju značajan utjecaj na rast plijesni i pojavu mikotoksina.

1.1.1. Okratoksini

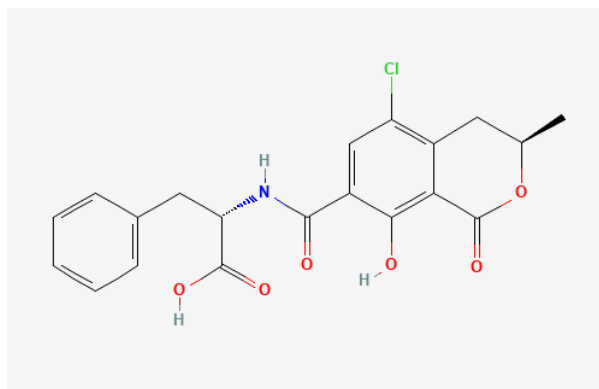
Okratoksin A je najpoznatiji i najistraživaniji oblik okratoksina kojeg proizvode gljive iz roda *Aspergillus* (najčešće *A. ochraceus* i *A. carbonarius*) i *Penicillium* (*P. verrucosum*).

Ove gljive rastu na različitim supstratima, uključujući žitarice, kavu, grožđe i suho voće, obično u uvjetima visoke vlage i temperature. Nakon što je konzumiran, okratoksin A se apsorbira u probavnom traktu i distribuira putem krvi u različite organe, gdje se akumulira, posebno u bubrežima. Ovaj mikotoksin se može metabolizirati u jetri, ali ostaje potencijalno štetan zbog svoje dugotrajne prisutnosti u organizmu.

Molekulska formula okratoksina A je $C_{20}H_{18}ClNO_6$, a njegova molekulska masa iznosi 403,8 g/mol. Okratoksin A je bijeli, kristalni prah koji je vrlo nestabilan u prisutnosti svjetlosti, ali relativno otporan na toplinu. Strukturno pripada derivatima fenilalanina, organoklornim spojevima, izokromanima, monokarboksilnim kiselinama amida i N-acil-L-fenilalanina (Slika 1) Ovaj mikotoksin se koristi u istraživanjima kao eksperimentalni teratogen i kancerogen. Spada u klasu lijekova koja djeluje selektivnom inhibicijom ulaska kalcija kroz stanične membrane. Okratoksin A je prilično stabilan u žitnim proizvodima, do 35% mikotoksina ostaje nakon autoklaviranja u trajanju do 3 sata, a kad se zagrijava do razgradnje, isijava vrlo toksične pare klorovodika i dušičnih oksida.

Okratoksini su strukturno povezani slabi organski anioni koji se sastoje od dihidroizokumarinske komponente povezane s fenilalaninom amidnom. Glavni članovi ove skupine uključuju okratoksin A (OTA), koji je najzastupljeniji i najotrovniji član. Okratoksin B, deklorirani derivat okratoksina A ima minimalnu toksičnost, okratoksin C je etil ester okratoksina A koji se može pretvoriti u okratoksin A u organizmu. Okratoksin - α je netoksični metabolit okratoksina A koji proizvodi crijevna flora i koji ne sadrži fenilalanin. Slično drugim mikotoksinima, Okratoksin A ima visoku otpornost na toplinu i slabo se razgrađuje pri kuhanju ili prilikom pečenja kruha.

Okratoksin A ima nefrotoksične efekte, uzrokujući oštećenje bubrežnih stanica i potencijalno dovodeći do kronične bubrežne bolesti. Također ima imunotoksične i kancerogene učinke, povezujući se s razvojem raka bubrega i drugih organskih sustava.



Slika 1. Strukturna formula okratoksina A. Izvor: PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information; 2024 [pristupljeno 2024 Kol. 27]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/442530>

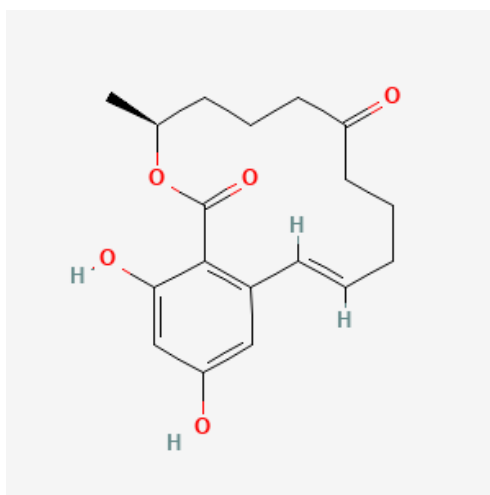
1.1.2. Zearalenon

Zearalenon je metabolit plijesni roda *Fusarium*, čija je kemijska struktura slična estrogenim hormonima, zbog čega se veže na estrogenske receptore i izaziva estrogene učinke u organizmu.

Molekulska formula zearalenona je $C_{18}H_{22}O_5$, a njegova molekulska masa iznosi 318,4 g/mol. Zearalenon se pojavljuje u formi bijelih mikrokristala ili bijelog praha. Zearalenon je makrolid koji se sastoji od četrnaestčlanog laktona spojenog s 1,3-dihidroksibenzenom (Slika 2). Spada u makrolide i pripada grupi rezorcinola, potencijalni je endokrini disruptor, anabolički ili estrogeni supstituent. Zearalenon je testiran na genotoksičnost, te pokazuje pozitivne rezultate na indukciju kromosomskih aberacija nakon izlaganja staničnih kultura sisavaca in vitro pri vrlo visokim koncentracijama. Hepatocelularni adenom i tumori hipofize uočeni su u studijama kancerogenosti na miševima, ali samo pri dozama daleko višim od koncentracija koje imaju hormonske učinke. Ti tumori su uzrokovani estrogenim učincima zearalenona te se sigurnost zearalenona može procijeniti na temelju doze koja nema hormonski učinak kod svinja, najosjetljivije vrste.

Zearalenon se metabolizira u crijevnim stanicama i ima dva glavna metabolita: α -zearalenol i β -zearalenol koji nastaju redukcijom zearalenona. Ostale forme zearalenona su α -zearalanol i β -zearalanol. U svom metaboliziranom obliku, zearalenon se može konjugirati s glukuronskom kiselinom. Zbog dvostruke veze u laktonskom prstenu pojavljuje se u dva izomera: trans i cis, pri čemu cis oblik ima veću afinitet prema estrogenim receptorima.

Izloženost zearalenonu može uzrokovati poremećaje mokraćno-spolnog sustava, dok ozbiljnija akutna ili kronična trovanja mogu ostaviti dugotrajne posljedice na reproduktivnim organima, uključujući degenerativne promjene testisa ili jajnika, sterilitet te pobačaje. Zearalenon utječe još i na imunološki i krvotvorni sustav. Zearalenon, te ostali mikotoksini iz roda *Fusarium*, najčešće se pojavljuju u žitaricama koje se uzgajaju u područjima s umjerenom klimom (2).



Slika 2. Strukturna formula Zearalenona. Izvor: PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information; 2024 [pristupljeno 2024 Kol. 27]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281576#section=Food-Additive-Classes>

1.1.3. Trihoteceni

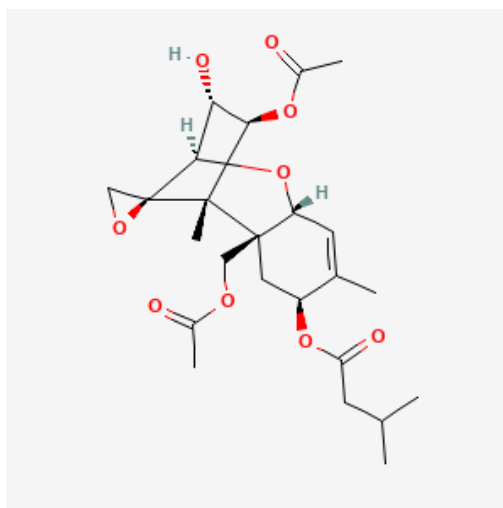
Mikotoksini trihoteceni su seskviterpenski spojevi koje prvenstveno proizvode gljive iz taksonomskih rodova poput *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichothecium* i drugih, pod specifičnim klimatskim uvjetima. Njih se može pronaći na raznim žitaricama (pšenici, kukuruзу, zobi, ječmu, riži), u hrani za dojenčad, kukuruznim pahuljicama, pivu, sladu, krmivima i krmnim smjesama.

Plijesan roda *Fusarium* je glavni patogen biljaka i proizvodi niz trihotecenskih mikotoksina uključujući deoksinivalenol, nivalenol, diacetoksiskirpenol, T-2 toksin i HT-2 toksin. Monogastrični organizmi su osjetljivi na deoksinivalenol, dok se perad i preživači čine manje osjetljivima na neke trihotecene zbog mikrobiološkog metabolizma trihotecena u probavnom traktu. Mikotoksini trihoteceni globalno su prisutni, no ukupne koncentracije toksina variraju s okolišnim uvjetima. Pravilne poljoprivredne prakse, poput izbjegavanja kasne žetve, uklanjanja ostataka biljaka iz polja zimi i izbjegavanja rotacije kukuruza i pšenice koja

pogoduje rastu *Fusariuma*, mogu smanjiti kontaminaciju žitarica trihotecenima. Zbog nejasne prirode toksičnih učinaka koje uzrokuju niske koncentracije trihotecena, teško je uspostaviti čvrstu povezanost između niske razine izloženosti i specifičnog trihotecena.

Trihoteceni čine obitelj preko šezdeset spojeva. To su spojevi koji djeluju direktno, za razliku od aflatoksina B1 koji zahtijeva metaboličku aktivaciju. Najpoznatiji član ove obitelji je T-2 toksin zbog svoje povijesne uloge u masovnim trovanjima među stokom i ljudima uslijed konzumacije kontaminiranih prehrambenih proizvoda te zbog svog potencijala za korištenje kao sredstvo biološkog ratovanja. T-2 proizvode vrste *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae* i *Fusarium sporotrichioides*.

Molekularna formula T-2 je $C_{24}H_{34}O_9$, a njegova molekulska masa iznosi 466,5 g/mol, strukturna formula prikazana je na slici (Slika 3). Mehanizam toksičnosti odnosi se na ometanje sinteze proteina. T-2 toksin ometa metabolizam membrane fosfolipida inhibirajući sintezu proteina te ometajući sintezu DNA i RNA. Često je odgovoran za kontaminaciju različitih usjeva žitarica i izaziva tešku upalnu reakciju kod životinja. Primarni učinci poremećene sinteze proteina uzrokovane T-2 toksinom vidljivi su u imunološkom sustavu i uključuju promjene u broju leukocita, odgođenu preosjetljivost, iscrpljivanje određenih progenitorskih stanica krvi te smanjenu formaciju antitijela.



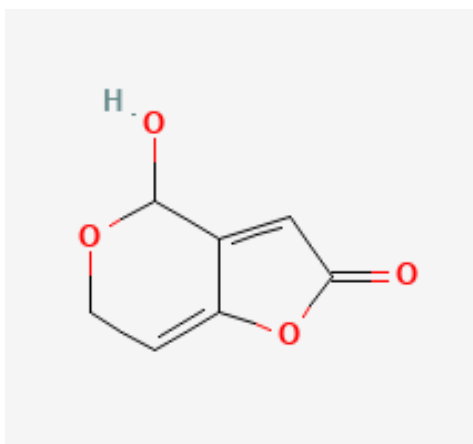
Slika 3. Strukturna formula T-2 toksina. Izvor: PubChem [Internet]. Bethesda (MD): NCBI; [pristupljeno 2024 Sep 2]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284461>

1.1.4. Patulin

Patulin je metabolit plijesni iz roda *Penicillium* te nekih vrsta iz roda *Aspergillus* i *Byssachlamys*. Njegova molekulska formula je $C_7H_6O_4$, a molekulska masa 154,12 g/mol. Po

kemijskoj strukturi spada u furopirane, laktone i gama-laktone (Slika 4). Izolirani patulin ima izgled kompaktnih prizmi ili debelih listića iz etera ili kloroforma. Ima antibakterijska svojstva i sudjeluje u apoptozi, ali se pokazalo da je kancerogen i mutagen. Može se naći u kruhu, kobasicama i voću. Poznat je po svojoj toksičnosti za mnoge biološke sustave, uzrokujući živčane i probavne poremećaje. Patulin se relativno slabo apsorbira u ljudskom tijelu jer se razgrađuju prije nego što dosegnu druga tkiva, osim probavnog trakta gdje uzrokuje lokalne toksične efekte, uglavnom probleme kao što su mučnina, povraćanje i proljev. Ne nakuplja se u velikim količinama u organizmu.

Patulin ima snažan afinitet prema tiolnim grupama, što mu omogućuje inhibiciju niza enzima, uključujući sukcinat dehidrogenazu, alkohol dehidrogenaze, ATPaze, acetilkolinesterazu, aldolaze, proteine tirozinske fosfataze, RNA polimeraze, aminoacil-tRNA sintazu, ribonukleazu H i laktat dehidrogenazu. Ova široka inhibicija enzima ima različite učinke, uključujući inhibiciju aerobne respiracije, inhibiciju sinteze RNA i inhibiciju sinteze proteina. Patulin također utječe na propusnost membrane i uzrokuje lomove u DNK te kromosomske aberacije, što doprinosi njegovoj genotoksičnosti, dodatno, nekad dovodi do razvoja alergija.



Slika 4. Strukturna formula patulina. Izvor: PubChem [Internet]. Bethesda (MD): NLM; [pristupljeno 2024 Aug. 27]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Patulin>

1.1.5. Aflatoksini

Među mikotoksinima, aflatoksini imaju najveći javnozdravstveni značaj. Aflatoksine uglavnom proizvode *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. Aflatoksini su prvi put identificirani kao mogući uzročnici koji su uništili preko 100.000 peradi oboljevši od takozvane „X bolesti purana“ u Engleskoj početkom 1960-ih godina. Ovi spojevi uključuju više od desetak

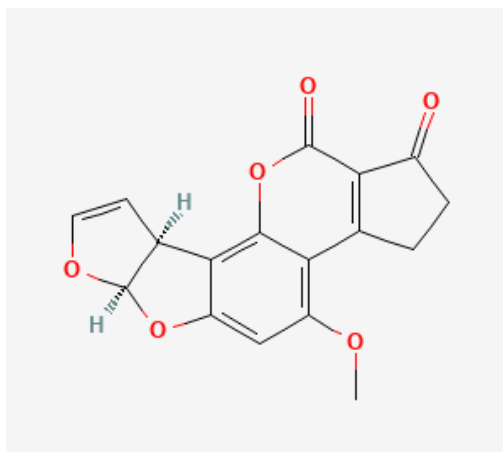
različitih članova, pri čemu je aflatoksin B1 najviše proučavan zbog svoje sposobnosti vezivanja za DNA nakon aktivacije enzima iz obitelji citokroma P450. Četiri glavna aflatoksina (B1, B2, G1 i G2) nazivaju se prema svojoj fluorescenciji pod plavim ili zelenim svjetlom te prema svojoj pokretljivosti tijekom tankoslojne kromatografije. Hidroksilirani metaboliti aflatoksina B1 i B2, poznati kao M1 i M2, mogu se pronaći u mlijeku i mliječnim proizvodima stoke koja je konzumirala kontaminiranu hranu.

Aflatoksini B1, B2, G1 i G2 kvantitativno su detektirani HPLC metodom na protočnoj ćeliji od 12 μ L u fluorometrijskom detektoru koristeći mobilnu fazu s toluenskim sustavom. Metoda se primjenjuje na ekstrakte hrane i stočnu hranu.

HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) metoda je analitički postupak koji se koristi za odvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju komponenata u smjesi. U HPLC-u, uzorak se otapa u tekućoj mobilnoj fazi i prolazi kroz kolonu ispunjenu stacionarnom fazom pod visokim tlakom. Različite komponente uzorka odvajaju se na temelju njihove interakcije sa stacionarnom fazom i putuju kroz kolonu u različito vrijeme. Detektor zatim mjeri i kvantificira odvojene komponente.

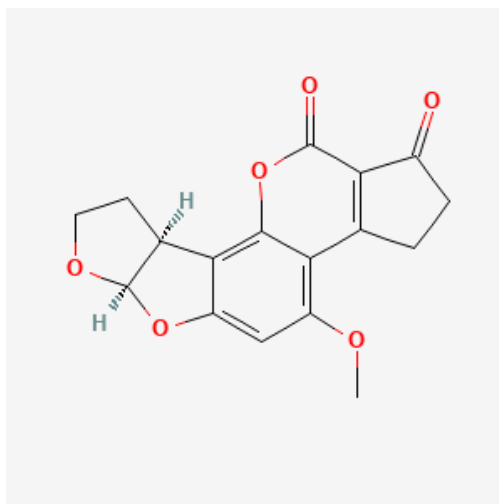
Prirodno prisutni aflatoksini su kancerogeni za ljude. Postoji dovoljno dokaza kod ljudi, ali i kod pokusnih životinja, da su aflatoksin B1 i prirodne smjese aflatoksina kancerogene.

Aflatoksin B1 je član skupine mikotoksina koje proizvode plijesni *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. Molekulska formula aflatoksina B1 je $C_{17}H_{12}O_6$. Njegova molekulska masa iznosi 312,27 g/mol. Aflatoksin B1 je najhepatotoksičniji i hepatokarcinogeniji od aflatoksina te se pojavljuje kao kontaminant u raznim namirnicama (Slika 5). Također, može uzrokovati oštećenje jetre i Reyeov sindrom, te biti uzrok smrti zbog akutne bolesti jetre.



Slika 5. Strukturna formula aflatoksina B1. Izvor: PubChem [Internet]. Bethesda (MD): NLM; [pristupljeno 2024 Kol. 29]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aflatoxin-B1>

Aflatoksin B2 proizvode gljive *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. Molekulska formula aflatoksina B2 je $C_{17}H_{14}O_6$, a njegova molekulska masa iznosi 314,29 g/mol. Naziv je dobio jer emitira plavu fluorescenciju pod UV svjetlom. Njegovu strukturu čine furan i dihidrobenzofuranski prsten (Slika 6). Aflatoksin B2 sadrže kontaminirane žitarice, orašasti plodovi i sjemenke. U prehrambenim proizvodima se pojavljuje u manjoj koncentraciji u odnosu na aflatoksin B1. U ljudskom i životinjskom organizmu, aflatoksin B2 se metabolizira u aflatoksin M1 što utječe na povećanje toksičnosti. Aflatoksin B2 je manje toksičan od aflatoksina B1, no može uzrokovati zdravstvene probleme, uključujući oštećenje jetre i imati potencijalni kancerogeni utjecaj, posebice prilikom dugotrajne izloženosti ili pri visokim koncentracijama.



Slika 6. Strukturna formula aflatoksina B2. Izvor: PubChem [Internet]. Bethesda (MD): NLM; [pristupljeno 2024 Kol. 29]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aflatoxin-B2>

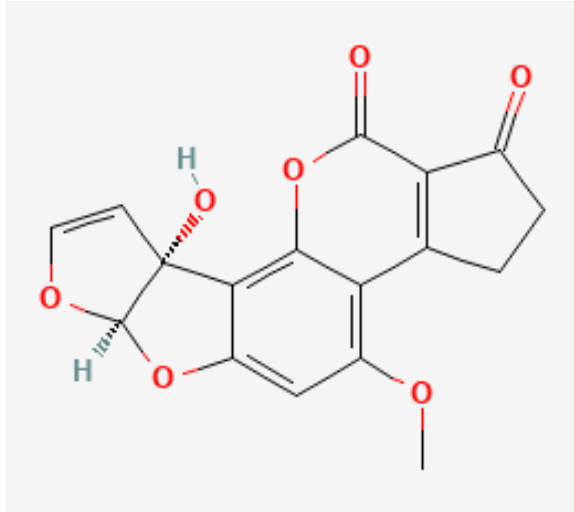
1.1.5.1. Aflatoksin M1

Aflatoksin B1 je hepatotoksičan i kancerogen te se u organizmu pretvara u aflatoksin M1, koji se izlučuje u mlijeku. Molekulska formula aflatoksina M1 je $C_{17}H_{12}O_7$, molekulske mase 328,27g/mol. Njegovu kemijsku strukturu čine aromatski eter, tercijarni alkohol i aromatski keton (Slika 7).

I aflatoksin B1 i aflatoksin M1 mogu uzrokovati bolesti kod ljudi, posebno primarni rak jetre, koji uključuje genetske mutacije gena P53 u DNK, oštećenje DNK, kromosomske anomalije i transformaciju stanica u stanicama sisavaca in vitro, u kucima, nižim eukariotima i bakterijama. Aflatoksin M1 je pokazao akutnu toksičnost i kancerogenost usporedivu s matičnom molekulom (aflatoksin B1), zbog čega je sada klasificiran od strane IARC-a kao kancerogen iz skupine 1 za ljude (4).

Kako bi se smanjio rizik od prisutnosti mikotoksina u namirnicama životinjskog podrijetla i time opasnost za ljudsko zdravlje, ključna je primjena suvremenih principa u primarnoj proizvodnji hrane. Pravilna priprema i skladištenje stočne hrane te sustavna kontrola prisutnosti mikotoksina u stočnoj hrani i prehrambenim sirovinama i proizvodima životinjskog podrijetla su postupci prilikom kojih se na vrijeme može reagirati prije nego krajnji proizvod dođe do potrošača (5).

Većina toksina je otporna na termalnu obradu, pasterizaciju, sterilizaciju i sušenje raspršivanjem tijekom procesiranja, što dovodi do njihovog prisustva u aktivnom obliku u obrađenom mlijeku i drugim mliječnim sirovim ili obrađenim proizvodima.



Slika 7. Strukturna formula aflatoksina M1. Izvor: PubChem [Internet]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=15558498&t=1> [pristupljeno 2024 Kol. 29].

1.2. Mikotoksikoze

Mikotoksini mogu imati različite štetne zdravstvene učinke i predstavljaju prijetnju za zdravlje ljudi i stoke. Dodatno, zbog prisutnosti mikotoksina u organizmima ljudi i stoke dolazi do povećanih troškova zdravstvene skrbi, smanjenih proizvodnih rezultata kod životinja, problema zbrinjavanja kontaminirane hrane i stočne hrane te ulaganja u brojna znanstvena istraživanja usmjerena na smanjenje kontaminacije.

Izloženost toksičnim gljivičnim metabolitima različitim načinima, kao što su ingestija, inhalacija ili kontakt s kožom, može dovesti do bolesti koje se kolektivno nazivaju mikotoksikoze. Te bolesti nastaju kao posljedica konzumiranja kontaminirane hrane, udisanja gljivičnih spora ili direktnim kontaktom s kontaminiranim materijalima. Štetni zdravstveni učinci mikotoksina polaze od akutnog trovanja do dugoročnih efekata poput imunosupresije i nekih vrsta raka. Mikotoksini imaju kumulativno djelovanje, simptomi mikotoksikoza u ranoj fazi su najčešće teško prepoznatljivi ili se pripisuju nekim drugim bolestima ili alergijama.

1.2.1. Aflatoksikoza

Aflatoksikoza je trovanje povezano s konzumacijom aflatoksina koje proizvode plijesni roda *Aspergillus*, prvenstveno *A. flavus*, u obliku spora ili kontaminirane hrane, što može

uzrokovati kroničnu ili akutnu aflatoksikozu kod ljudi i životinja. Kronična aflatoksikoza uključuje rak jetre, ljudski hepatični karcinom, usporen rast, smanjeni imunitet i cirozu kod neuhranjene djece. Akutna aflatoksikoza uključuje visoku temperaturu, povraćanje, zatajenje jetre, edem nogu i žuticu, s visokom stopom smrtnosti u usporedbi s kroničnom aflatoksikozom.

1.2.2. Interakcija HBV i aflatoksina u patogenezi hepatocelularnog karcinoma

Hepatocelularni karcinom (HCC) je rak jetre koji pretežno pogađa muškarce. Omjer muškaraca i žena kod HCC povezanog s hepatitisom B (HBV) iznosi od 6 do 8:1. Razlog za to dolazi iz molekularnih istraživanja koje su identificirale elemente odgovora androgenih receptora pojačivača I i HBV genoma. Ovi cis-elementi povećavaju HBV transkripciju i titar virusa, što predstavlja rizik za nastanak HCC, posebno kod muškaraca. Većina HCC povezanih s HBV sadrži integrirane HBV DNA sekvence u kojima zadržani virusni pojačivač I povećava transkripciju domaćinskog onkogeno. Pojačanje ovih transkripata testosteronom je još jedan mehanizam koji pogoduje razvoju HCC kod muškaraca.

Osim infekcije HBV-om, okolišni faktori, posebno izloženost aflatoksinu, povećavaju kod muškaraca rizik za oboljevanje HCC-om otprilike 3 do 4 puta. Aflatoksin je genotoksična kemikalija koja stvara adukt aflatoksin-B1-N7-gvanin. HBV i aflatoksin zajedničkim djelovanjem pojačavaju razvoj raka jetre kod muškaraca.

Otkriveno je da muški HCC pacijenti imaju višu ekspresiju gena za metabolizam aflatoksina (AHR i CYP1A1), ali niže razine faktora za popravak DNA u procesu nehomolognog spajanja krajeva u usporedbi sa ženama.

1.3. Faktori okoliša koji utječu na rast plijesni i proizvodnju aflatoksina

Abiotski faktori poput temperature, aktivnosti vode, pH, ugljika i dušika imaju veliki utjecaj na proces biosinteze aflatoksina. Kontaminacija aflatoksinima uvelike ovisi o temperaturi i aktivnosti vode. Ovi uvjeti potiču rast gljiva koje proizvode aflatoksine, posebno *A.flavus*, te također imaju značajan utjecaj na aktivaciju genetskog klastera za proizvodnju aflatoksina. Viša aktivnost vode pogoduje boljem rastu gljiva i sintezi toksina. Aktivnost vode od otprilike 0,99 aw i temperatura od 29–30 °C potiču proizvodnju aflatoksina. Oba ova faktora, temperatura i aktivnost vode (aw), imaju ključnu ulogu u transkripciji dva važna regulatorna gena (aflR i aflS). Temperature ispod 25 °C i iznad 37 °C nisu pogodne za rast i proizvodnju

aflatoksina, dok razine vlage ispod 0,85 aw usporavaju rast i proizvodnju toksina, a potpuno se zaustavljaju na 0,70–0,75 aw.

1.4. Plijesni i mikotoksini u krmivu

Fusarium i *Alternaria* plijesni, poznate kao poljske plijesni, najčešće proizvode mikotoksine na polju tijekom vegetacije i odmah nakon žetve. Nasuprot tome, *Aspergillus* i *Penicillium* plijesni, koje se nazivaju skladišne plijesni, obično napadaju krmiva nakon žetve, tijekom sušenja i skladištenja (1).

Ekonomski utjecaj mikotoksina je značajan jer smanjuju prinos i tržišnu vrijednost usjeva u cijelom proizvodnom lancu.

Rizik od pojave mikotoksina i razina kontaminacije ovisi o nekoliko čimbenika:

1. Vrsta usjeva: različite vrste usjeva imaju različitu osjetljivost.
2. Vremenski uvjeti: ekstremni vremenski uvjeti, uključujući visoke temperature i previše ili premalo vlage, utječu na razinu mikotoksina.
3. Geografsko područje: lokalna klima i okolišni uvjeti igraju ulogu.
4. Primjena fungicida: upotreba fungicida može utjecati na smanjenje mikotoksina.
5. Prakse žetve: pravilna žetva je ključna.
6. Uvjeti skladištenja i sušenja: temperatura i vlaga tijekom ovih procesa su kritični (1).

Kukuruz je posebno osjetljiv na kontaminaciju aflatoksinima tijekom cvatnje i nalijevanja zrnja. Vlažni uvjeti sušenja ili prirodno sušenje u otvorenim silosima mogu dovesti do razvoja skladišnih plijesni i proizvodnje aflatoksina. Krave hranjene krmivima koja sadrže ostatke sjemenki tropskih uljarica mogu proizvoditi mlijeko kontaminirano aflatoksinima (1).

Napori za smanjenjem mikotoksina uključuju smanjenje njihove koncentracije, njihovo uklanjanje ili uništavanje te sprečavanje njihove apsorpcije u metabolizam životinja, uz očuvanje hranjivosti krmiva i razmatranje ekonomske isplativosti, pri tome se koriste različite metode:

1. Kemijska sredstva: kalcijev hidroksid, amonijev dihidroksid, sumporni dioksid i drugi kemijski agensi koriste se za uklanjanje mikotoksina.
2. Agensi specifični za aflatoksine: amonijak, propionska kiselina, natrijev propionat i benzojeva kiselina mogu biti učinkoviti.

3. Mikroorganizmi: mliječno kisele bakterije i kvasci s enzimskim sposobnostima mogu razgraditi aflatoksine.
4. Adsorbensi: dodavanje tvari poput silikatne gline, aktivnog ugljena, aluminosilikata, zeolita i klorofilina u krmne smjese pomaže u uklanjanju mikotoksina iz probavnog sustava. Ovi adsorbensi djeluju u različitim uvjetima kiselosti, vlažnosti, temperature i brzini razgradnje hrane (1).

Kako bi se ublažili nepovoljni učinci aflatoksina, krmivu se mogu dodati nutritivni dodaci poput antioksidansa, vitamina A, vitamina E, bakra ili cinka iz razloga što aflatoksini smanjuju razinu vitamina A, E i D u krvi životinja.

1.4.1. Biomonitoring usjeva

Biološka kontrola usjeva uključuje upotrebu bio-pesticida izrađenih od atoksigenih sojeva koji nemaju sposobnost proizvodnje aflatoksina, čime se smanjuje prisutnost aflatoksina na poljima. Korištenje različitih bakterijskih ili gljivičnih izolata također može pomoći u kontroli aflatoksina.

1.5. Mikotoksini u kravljem mlijeku

Mlijeko je jedan od najvažnijih prehrambenih proizvoda zdrave i uravnotežene ljudske prehrane, budući da je visoko konzumiran u svim dobno-uzrasnim skupinama ono predstavlja izvor životinjskih proteina i esencijalnih hranjivih tvari, posebno za djecu. Kravlje mlijeko, konkretno, glavna je vrsta mlijeka koja se koristi u ljudskoj prehrani.

Izloženost životinja kontaminiranoj hrani dovodi do njihovog izlučivanja u mlijeko preko mliječnih žlijezda. Jednom uneseni u preživače, toksini se metaboliziraju, biotransformiraju i prenose na životinjske proizvode, postajući rizik za ljudsko zdravlje.

Mala količina toksina izlučuje se u mlijeku, no neki se mikotoksini mogu vezati za mliječne kazeine. U tom slučaju, sir i drugi mliječni proizvodi životinjskog podrijetla tada sadrže veće količine mikotoksina nego li mlijeko u početnoj fazi proizvodnje.

1.6. Ispitivanje sirovog mlijeka

Sirovo mlijeko se testira na širok spektar kontaminanata prije nego što napusti cisternu, uključujući aflatoksin M1. Ovo testiranje može se obaviti na farmi ili tijekom prijema u

mljekari. Testiranje se obično provodi pomoću brzog testiranja testne trakice. Često, ako se otkriju visoke razine kontaminanata, sirovo mlijeko će biti odbijeno u ovoj fazi. Izazovi u ovoj fazi uključuju točno otkrivanje, budući da sirovo mlijeko sadrži značajnu količinu masti koja može ometati rezultate testiranja.

Nakon što sirovo mlijeko prođe početno testiranje, testira se od strane mljekare pomoću ELISA metode za kvantifikaciju razine aflatoksina M1. Ovi podaci potvrđuju je li mlijeko prikladno za daljnju preradu u mliječne proizvode. ELISA testovi su relativno jeftini i jednostavni za izvođenje na licu mjesta. Nakon obrade, konačni proizvod također se mora testirati prije puštanja na tržište kako bi se osiguralo da ispunjava propisane smjernice. Ako se dodaju bilo kakvi aromatizatori za stvaranje konačnog produkta također se mora testirati na ukupni aflatoksin zajedno s aflatoksinom M1 kako bi se osiguralo da nije došlo do dodatne kontaminacije iz aromatizatora.

Centar za kontrolu kvalitete stočarskih proizvoda (CKKSP) je jedna od sastavnica Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu (HAPIH) koja nadzore poslove stočarstva te kontrolira kvalitetu mlijeka uz obavljanje laboratorijskih ispitivanja uzoraka mlijeka.

1.6.1. Brzi kvantitativni test – AflaSensor

AflaSensor nova (KIT041N) brzi je kvantitativni test koji omogućuje utvrđivanja na prisutnost ili odsutnost molekula aflatoksina M1 (AFM1) u uzrocima kravljeg sirovog mlijeka. AflaSensor nova je kompetitivni test koji koristi specifično antitijelo s visokim afinitetom za AFM1 molekule. Test zahtijeva korištenje dvije komponente: prva komponenta je mikrojažica koja sadrži unaprijed određene količine liofiliziranog reagensa vezanih za čestice zlata, a druga je mjerna trakica koja se sastoji od skupa membrana sa specifičnim linijama za hvatanje.

Ovaj test mjernom trakicom ne zahtijeva obradu uzorka, čišćenje ili ekstrakciju. Test traje 10 minuta na 40 °C, potrebne su 3 minute za inkubaciju i 7 minuta za migraciju. Rezultati se dobivaju izravno korištenjem instrumentalnog očitavanja pomoću ReadSensor 2 čitača.

Granica kvantifikacije (engl. *Limit of Quantification*; LOQ) u AflaSensor kitu u sirovom mlijeku je 20 ppt s rasponom kvantifikacije od 20 do 150 ppt. Granica pozitivnosti ili granica od koje uzorak može biti potencijalno kontaminiran na europskoj maksimalnoj razini (50 ppt) je definirana u potvrdi o sukladnosti.

Uređaji koji su potrebni za provođenje AflaSensor testa su inkubator HeatSensor DUO i čitač rezultata ReadSensor 2.

Inkubator HeatSensor koristi se da bi svi UniSensor testovi imali fiksnu temperaturu inkubacije bez obzira na temperaturu okoline/radnu temperaturu. HeatSensor potreban je u ovom ispitivanju kako bi obje testne trakice uronjene u jažice, bile inkubirane na 40°C tijekom 3 minute (Slika 8). Za to vrijeme reagens pomiješan s uzorkom mlijeka migrira iz jažice uzduž testne trakice koju je potom potrebno ostrugati i postaviti u ladicu ReadSensor čitača.



Slika 8. HeatSensor DUO. Izvor: Noack Group [Internet]. Dostupno na: <https://noackgroup.com/hr/product/heatsensor-duo/> [pristupljeno 02.09.2024.].

ReadSensor 2 čitač je instrument za očitavanje imunokromatografskih testova na trakicama proizvođača UniSensor. Vrijeme detekcije iznosi manje od deset sekundi. Mjereći refleksiju intenziteta svjetlosti testnih linija, uređaj detektira uzorke pozitivno ili negativno.

Postupak i način rukovanja ReadSensor 2 čitačem (Slika 9):

1. Kalibracija uređaja.
2. Izbor metode: na stranici TEST kliknemo na polje METHOD i odaberemo metodu namijenjenu testiranju uzorka na aflatoksin iz mlijeka, metoda 041N.
3. ID uzorka: unos ID uzorka koji se trenutno ispituje.
4. Testiranje i rezultat: klikom na ikonu TEST, ladica za uzorak će se automatski uvući u instrument i test će se pokrenuti. Rezultat testa će se prikazati po završetku očitavanja testa.

5. Ispis rezultata testa: klikom na ikonu PRINT ispisuje se trenutni rezultat testa.
6. Izveštaj: na stranici izvještaji nalazi se polje REPORT, klikom na ovo polje prikazuju se svi dobiveni rezultati.
7. Detalji rezultata: po završetku testa, klikom na rezultat vide se detalji rezultata.



Slika 9. ReadSensor 2 čitač. Izvor: Noack Group [Internet]. Dostupno na: <https://noackgroup.com/hr/product/readsensor-2/> [pristupljeno 02.09.2024.].

2. CILJ RADA

Cilj ovog istraživanja je utvrditi prisutnost i razinu aflatoksina u uzorcima komercijalnih i sirovih mlijeka koristeći AflaSensor nova (KIT041N) set uz uređaj za inkubaciju HeatSensor DUO i čitač testnih trakica ReadSensor 2. Također, istražuje se usklađenost s važećim zakonskim pravilnicima u kojima su iskazane dopuštene količine aflatoksina u mlijeku i mliječnim proizvodima u svrhu osiguranja sigurnosti hrane te smanjenju rizika od unosa kontaminanata u organizam.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci kravljeg mlijeka

U eksperimentalnom radu u laboratoriju korišteno je sveukupno devet uzoraka kravljeg mlijeka. Radi očuvanja neutralnosti i objektivnosti istraživanja, u ovom radu nazivi proizvođača mlijeka su zamijenjeni općim izrazom „komercijalno kupljeno mlijeko“ (Tablica 1). Nasumično su kupljena četiri različitih komercijalno zapakiranih mlijeka u trgovinama u Rijeci, jedno mlijeko kupljeno je u mini mljekari u Rijeci, te je preostalih četiri uzorka domaćeg svježeg sirovog mlijeka prikupljeno na području okolice Rijeke (općina Klana i grad Kastav) ta na području okolice Siska (grad Sisak). Uzorci domaćih sirovih mlijeka uzorkovani su s manjih farmi.

Uzorci 1., 2., 3. i 4. kupljeni su u većim trgovačkim objektima, od dva različita proizvođača. Prvo mlijeko je trajno sterilizirano mlijeko s 2,8% m.m., drugo mlijeko je sterilizirano homogenizirano mlijeko bez laktoze s 2,8% m.m., slijedeće je sterilizirano homogenizirano trajno mlijeko također s 2.8% m.m. i posljednji uzorak; svježe pasterizirano mlijeko s 3.2% m.m.. Peti uzorak svježeg pasteriziranog nehomogeniziranog mlijeka s 3.2% m.m. kupljeno je u mini mljekari. Uzorci svježih sirovih domaćih mlijeka korištenih u ispitivanju uzorkovani su u sterilne boce na dan ispitivanja na mjestima Studena i Kraljevac u okolici Rijeke. Uzorci svježih sirovih domaćih mlijeka s područja Topolovac i Budaševa u Sisku uzorkovani su tri dana prije ispitivanja u laboratoriju te su transportirani do Rijeke na adekvatan način i skladišteni u hladnjaku do dana ispitivanja zbog očuvanja mikrobiološkog sastava.

Uzorci su skladišteni u hladnjaku na temperaturi +4°C u originalnoj ambalaži, a netom prije analize svi su uzorci numerirani i stavljeni u epruvete s poklopcem volumena 50 mL u kojima su homogenizirani tijekom 10 sekundi na stolnom homogenizatoru.

Tablica 1. Uzorci kravljeg mlijeka

KOMERCIJALNO KUPLJENA MLIJEKA				
	VRSTA MLIJEKA	POSTUPAK OBRADJE	UDIO MLIJEČNE MASTI	ISTEK ROKA
1.	trajno mlijeko	sterilizirano	2,8%	17.03.2024.
2.	mlijeko bez laktoze	sterilizirano, homogenizirano	2,8%	15.05.2024.
3.	trajno mlijeko	sterilizirano, homogenizirano	2,8%	25.06.2024.
4.	svježe mlijeko	pasterizirano	3,2%	06.03.2024.
5.	svježe mlijeko	pasterizirano, nehomogenizirano	3,2%	02.03.2024.
SVJEŽA DOMAĆA MLIJEKA				
	LOKACIJA UZORKOVANJA	POSTUPAK OBRADJE	DATUM UZORKOVANJA	
6.	Studena, Klana	Sirovo, bez obrada	28.02.2024.	
7.	Topolovac, Sisak		20.05.2024.	
8.	Budaševo, Sisak		20.05.2024.	
9.	Kraljevac, Kastav		23.05.2024.	

3.2. Određivanje prisutnosti aflatoksina u uzorcima mlijeka - AflaSensor nova UNISENSOR

Za ispitivanje uzoraka mlijeka koristili smo AflaSensor nova kit (KIT041N) koji sadrži sve što je potrebno za izvođenje 96 mjerenja prisutnosti aflatoksina M1 u sirovom mlijeku. AflaSensor nova kit sastoji se od: 12 epruveta od kojih svaka ima 8 mikrojažica s reagensima i 8 mjernih trakica, jedne pozitivna kontrola, mikropipete od 200 µl i jednokratnih nastavaka za mikropipetu (Slika 10). Pozitivna kontrola u kitu je liofilizirani toksin Afla M1 u puferu koji

daje pozitivan rezultat. Potrebno je koristiti sirovo mlijeko bez aflatoksina za standardizaciju pozitivne kontrole. Kao negativna kontrolu se koristi sirovo mlijeko bez aflatoksina.



Slika 10. AflaSensor nova kit. Izvor: Unisensor [Internet]. Dostupno na: <https://unisensor.be/assets/f4869fe4-e8d3-4114-8a81-52cdb98b2bd3/aflasensor-nova-kit041n-brochure.pdf> [pristupljeno 02.09.2024.].

Za analizu uzoraka mlijeka potrebno je dodati 200 μ L sirovog mlijeka (homogeno i temperature između $+4^{\circ}\text{C}$ i $+10^{\circ}\text{C}$) u mikrojažicu reagensa i resuspendirati 6 puta do homogenosti. Resuspendirani uzorci u mikrojažicama stavljaju se na inkubaciju u HeatSensor uređaj tijekom 3 min na 40°C . Testne trakice je potrebno staviti na odgovarajuće mjesto na HeatSensor uređaju. Nakon 3 min inkubacije, testne trakice se automatski spuštaju u mikrojažicu te se umoče u uzorak mlijeka. U tome trenutku kreće inkubacija tijekom 7 minuta na 40°C . Nakon toga, trakice je potrebno izvaditi iz jažica te očitati rezultat na ReadSensor2 uređaju unutar 2 minute.

3.3. Interpretacija rezultata

Razvoj boje na „testnoj“ liniji ukazuje na odsutnost AFM1 u uzorku mlijeka. Suprotno tome, prisutnost AFM1 u uzorku ometa reagens koji oboje liniju 'test'. Smanjenje intenziteta signala na „testnoj“ liniji ovisi o količini AFM1 u uzorku. Iz ovog intenziteta i kalibracijske krivulje specifične za seriju (datoteka metode), čitač može točno odrediti koncentraciju AFM1 prisutnog u uzorku mlijeka.

U svim slučajevima „kontrolna“ linija mora biti obojena kako bi se validirao test kojeg će potvrditi čitatelj. Rezultati su interpretirani prema uputstvima za korištenje AflaSensor nova kita, dobivenih od proizvođača (Tablica 2).

Oznaka LOQ (granica kvantifikacije) AflaSensor nova u sirovom mlijeku iznosi 20 ppt, s rasponom kvantifikacije od 20 do 150 ppt. Ona predstavlja graničnu vrijednost za pozitivnost ili granicu od koje uzorak može biti potencijalno kontaminiran prema europskoj maksimalnoj dozvoljenoj razini (50 ppt) te je definirana u certifikatu o usklađenosti koji se dobije u setu.

ReadSensor može za neki uzorak dati odgovor NaN, nedostupna vrijednost koju čitač očitava za visoko kontaminirane uzorke. Oznaka NaN obično se koristi kada uređaj nije u mogućnosti očitati ili izračunati valjanu vrijednost za određeni parametar. To se može dogoditi kada je koncentracija analiziranog spoja, u ovom slučaju aflatoksina M1, ispod detekcijskog praga. Osim toga, može označavati i neispravan uzorak ili grešku u mjerenju (ako postoji problem s uzorkom, kontaminacija ili tehnička greška tijekom analize).

Cut-off predstavlja razinu AFM1 na kojem uzorak mlijeka može biti potencijalno kontaminiran pri 50 ppt, te je tada potrebno pogledati Certifikat usklađenosti koji se dobije u kitu.

Tablica 2. Razina kontaminacije AFM1 u sirovom mlijeku

	Rezultat AFM1 linije	Kvalitativni odgovor koji daje čitač	Kvantitativni odgovor koji daje čitač	Napomene
NEMA AFM1 ili [AFM1] < 20 ppt	NEG	NO_AFLA < LOQ (U skladu s EU zakonodavstvom)	NaN ili koncentracija AFM1 izražena u ppt (ng/Kg)	Koncentracija se ne smije smatrati točnom. Rezultat je ispod „Granice kvantifikacije“ (LOQ)
[AFM1] je u rasponu 20 ppt - cut-off	LPOS	AFLA < cut-off (U skladu s EU zakonodavstvom)	Koncentracija AFM1 izražena u ppt (ng/Kg)	Koncentracija AFM1 je između LOQ i cut-off granice. % CV rezultata je < 20 %
[AFM1] > cut-off	POS	AFLA > cut-off (Neusklađeno s EU zakonodavstvom)	NaN ili koncentracija AFM1 izražena u ppt (ng/Kg)	Koncentracija AFM1 je viša od cut-off granice. %CV rezultata je <10%. Za koncentracije >150

				ppt vrijednost se ne smije smatrati točnom
--	--	--	--	--

4. REZULTATI

4.1. Količina aflatoksina M1 u uzorcima komercijalnih mlijeka

Prilikom očitavanja rezultata s uređaja ReadSensor svih 5 uzoraka komercijalnih mlijeka, četiri uzorka iz trgovina te jedan iz mljekare, uređaj nije očitao zamjetnu količinu aflatoksina M1 nakon testiranja (Tablica 3). Vrijednosti za te uzorke obilježene su kraticom NaN (engl. *Not a Number*). NaN uglavnom označava da je koncentracija aflatoksina M1 u komercijalnom mlijeku toliko niska da je ispod granice detekcije uređaja, što znači da je praktički nemjerljiva i samim time sigurna prema standardima. Dobiveni rezultati za komercijalna mlijeka su očekivani obzirom da su tvrtke u Hrvatskoj obavezne po zakonu provoditi ispitivanje na aflatoksin prije stavljanja proizvoda na tržište.

Tablica 3. Očitane vrijednosti količine aflatoksina M1 za uzorke komercijalnih mlijeka

REDNI BROJ	UZORAK MLIJEKA	DATUM ANALIZE	KONCENTRACIJA AFM1	OZNAKA UREĐAJA
1.	trajno mlijeko	28.02.2024.	NaN	NEG
2.	mlijeko bez laktoze	28.02.2024.	NaN	NEG
3.	trajno mlijeko	28.02.2024.	NaN	NEG
4.	svježe mlijeko	28.02.2024.	NaN	NEG
5.	svježe mlijeko *iz mljekare	28.02.2024.	NaN	NEG

4.2. Količina aflatoksina M1 u uzorcima domaćih sirovih mlijeka

U svim uzorcima domaćih sirovih mlijeka uređaj je detektirao aflatoksin M1 (Tablica 4). Uzorak broj 7, s područja Topolovca, Sisak, ima najnižu očitano vrijednost aflatoksina M1 koja iznosi 10,45 ppt te označen negativno. Slijede uzorci 8 s područja Budaševa, Sisak, s vrijednošću 14,68 ppt, i uzorak 6 s područja Studene, Klana, očitane količine aflatoksina M1 16,48 ppt čija je koncentracija blizu granične vrijednosti za pozitivan rezultat, označena kao negativna, što znači da je uzorak siguran prema propisima, ali blizu gornje granice. Uzorci

sadrže prihvatljivu količinu aflatoksina M1 prema maksimalno dozvoljenoj količini za aflatoksin M1 koja je propisana prema Uredbi Europske unije broj 1881/2006 o maksimalnim razinama za određene kontaminante u hrani te prema Zakonu o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu i Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (15) u kojima je propisana dozvoljena vrijednost 0,05 µg/kg za sirovo mlijeko te 0,025 µg/kg za mlijeko za dojenčad. Uzorak se smatra sigurnim za populaciju, za sve dobne skupine.

Količina aflatoksina M1 očitana u uzorku domaćeg sirovog mlijeka, broj 9, s područja Kraljevca, Kastav, iznosi 25,80 ppt. Oznaka za očitane količine je LNEG afla<cut-off koja označava da se koncentracija AFM1 nalazi između LOQ-a (granice kvantifikacije) i granične vrijednosti od 50 ppt. Ovaj uzorak mlijeka sadrži najveću vrijednost aflatoksina M1 te kao takav nije namijenjen konzumaciji dojenčadi jer premašuje najveću dopuštenu količinu aflatoksina, a to je 0,025 µg/kg.

Tablica 4. Očitane vrijednosti količine aflatoksina M1 za uzorke domaćih sirovih mlijeka

REDNI BROJ	LOKACIJA UZORKOVANJA	DATUM ANALIZE	KONCENTRACIJA AFM1	OZNAKA UREĐAJA
6.	Studena, Klana	28.02.2024	16,48	LNEG AFLA<cut-off
7.	Topolovac, Sisak	23.05.2024	10,45	NEG NO_AFLA<LOQ
8.	Budaševo, Sisak	23.05.2024	14,68	NEG NO_AFLA<LOQ
9.	Kraljevac, Kastav	23.05.2024	25,80	LNEG AFLA<cut-off

5. RASPRAVA

Aflatoksin, toksičan mikotoksin, produkt plijesni, prisutan je u stočnoj hrani koja je hrana životinjama što čini ispitivanje mlijeka na prisustvo aflatoksina izuzetno važnim. Životinja koja se hrani kontaminiranim žitaricama, biljkama i plodovima u svoj organizam unosi aflatoksin. On se akumulira u organima i tkivima životinja čiji su produkti hrana čovjeku. Najbolji primjer kako se u ljudski organizam unese aflatoksin je konzumirajući mlijeko životinja koje ga proizvode. Ovaj proces predstavlja lanac u kojem štetna tvar, aflatoksin, nastaje, ulazi i nakuplja se u organizmu životinje, produktu te potom dopijeva u organizam čovjeka. Problem kod kravljeg mlijeka je što u njemu nalazimo štetan oblik aflatoksina, aflatoksin M1 nastao hidrosilacijom aflatoksina B1.

Dobiveni rezultati za svih 5 uzoraka komercijalnih mlijeka su zadovoljavajući i očekivani. Koncentracija aflatoksina M1 u komercijalnom mlijeku je toliko niska da je ispod granice detekcije uređaja. Uzorci mlijeka iz trgovačkih lanaca i mljekare u Rijeci su sigurni za konzumaciju s obzirom da nisu utvrđene nedopuštene količine aflatoksina M1.

Aflatoksin M1 našao se u svim uzorcima domaćih sirovih mlijeka. Uzorci sadrže prihvatljivu količinu aflatoksina M1 prema maksimalno dozvoljenoj količini za aflatoksin M1 koja je propisana prema Uredbi Europske unije koja dozvoljava vrijednost od 0,05 µg/kg za sirovo mlijeko te 0,025 µg/kg za mlijeko za dojenčad. Količina aflatoksina M1 očitana u uzorku domaćeg sirovog mlijeka s područja Kastva sadrži najveću vrijednost aflatoksina M1 te kao takvo nije namijenjeno konzumaciji dojenčadi jer premašuje najveću dopuštenu količinu aflatoksina M1 u mlijeku namijenjenom dojenčadi.

Prema Uredbi (EC) broj 1881/2006 o maksimalnim razinama za određene kontaminante u hrani (European Parliament and Council, 2006) propisane su najveće dopuštene količine aflatoksina M1 u hrani. Dopuštena je maksimalna količina od 0,05 µg/kg za sirovo mlijeko, termički obrađeno mlijeko te mlijeko koje se koristi u svrhu proizvodnje mliječnih proizvoda. Za proizvode namijenjene dojenčadi, u koje se ubraja početno i prijelazno mlijeko za dojenčad, maksimalna dopuštena količina je manja s obzirom na osjetljivost i na veći utjecaj aflatoksina M1 na dojenčad u odnosu na odraslu populaciju, te iznosi 0,025 µg/kg.

Uzorci svježeg mlijeka s područja Siska (Sisačko – moslavačka županija) prikazuju bolje rezultate od svježih mlijeka na području Klane i Kastva (Primorsko – goranska županija).

Kako bi utvrdili jesu li stvarno mlijeka s područja Sisačko – moslavačke županije kvalitetnija, po pitanju manje količine aflatoksina M1, trebalo bi ispitati još nekoliko domaćih svježih mlijeka s različitih mjesta, odnosno farmi iz županije kako bi rezultat bio reprezentativniji. Bez obzira na veću ili manju količinu aflatoksina M1, svi uzorci domaćih sirovih mlijeka sadrže prihvatljivu količinu kontaminanta te su u skladu s propisima Europske unije.

Primijenjena metoda pomoću uređaja HeatSensora DUO i Readsensora 2 čitača s kompatibilnim setom AflaSensor nova omogućuje brzu izvedbu i očitavanje rezultata budući da se radi o kvantitativnom testu koji utvrđuje količinu aflatoksina M1 u uzorcima kravljeg sirovog mlijeka, a pritom ne zahtijeva obradu uzorka, čišćenje ili ekstrakciju. Nadalje, test ne zahtijeva uzorak velikog volumena, dovoljno je samo 200 µl uzorka.

Korišteni uzorci mlijeka u ovom ispitivanju nisu zahtijevali dodatnu termičku obradu, već su pojedini uzorci sirovog mlijeka direktno testirani nakon same mužnje krave. Prednosti ovakvog testiranja je što sami test zahtijeva svega 10 minuta za izvođenje odmah na terenu ili za vrijeme prijema mlijeka u mljekarama. Negativni uzorci mlijeka na aflatoksin M1 ili uzorci čiji je sadržaj aflatoksina M1 u prihvatljivim granicama spremni su za daljnju obradu, termičke procese te preradu u novi mliječni proizvod. Uz primjenu ovog brzog testa moguće je daljnje postupanje s mlijekom na ispravan način uz doprinos većoj sigurnosti i smanjenju rizika od opasnosti za ljude i životinje.

Ukoliko se žele potvrditi rezultati testiranja može se naknadno napraviti ELISA test ili neki drugi test za detekciju aflatoksina u uzorcima.

Propisi o maksimalnim dopuštenim količinama aflatoksina M1 (AFM1) u mlijeku razlikuju se širom svijeta. Europska unija odredila je najnižu dopuštenu koncentraciju AFM1 od 50 ng/L u tekućem, sušenom ili prerađenom mlijeku. U Sjedinjenim Američkim Državama te nekim latinoameričkim zemljama dopuštene su veće koncentracije AFM1 od 500 ng/L. Kina dopušta maksimalnu granicu od 62,5 ng/L (17).

Studija iz 2020.godine pokazala je visoke razine aflatoksina M1 (AFM1) u formulama za dojenčad distribuiranim u Monterreyu u Meksiku. Od ukupno 55 analiziranih uzoraka, 20% je imalo razinu toksina koja nadmašuje maksimalnu granicu postavljenu od strane Europske Unije, s koncentracijama u rasponu od 40 do 450 ng/L. Analizom uzoraka prema vrsti formule za dojenčad i dobi djece, uočene su različite koncentracije AFM1: 20 ng/L u početnim formulama za dojenčad do godine dana i 180 ng/L u nastavnim formulama za djecu između jedne i dvije godine. Na temelju prosječne tjelesne mase analiziranih skupina, izračunat je

dnevni unos aflatoksina M1 koji se kreće između 1,56 i 14 ng/kg tjelesne mase dnevno. Ovi rezultati korišteni su za procjenu koeficijenta rizika, koji je pokazao prisutnost rizika u svim analiziranim skupinama. Na temelju ovih nalaza, nužno je da regulatorne agencije i proizvođači mlijeka ulože napore u svrhu smanjenja razina AFM1 u mlijeku, osobito u sirovinama koje se koriste za proizvodnju formula za dojenčad, zbog visokog rizika od raka povezanog s AFM1 i povećane osjetljivosti dojenčadi (19).

Unatoč napredovanju u tehnologijama testiranja, izazovi poput visoke osjetljivosti na aflatoksine i potreba za još bržim, preciznijim i efikasnijim načinima za otkrivanje aflatoksina u mlijeku i ostalim namirnicama te stočnoj hrani, ostavljaju prostora za buduća istraživanja ovog štetnog kontaminanta. Smanjenju rizika za obolijevanje uzrokovano aflatoksinom doprinose svakodnevna otkrivanja novih metoda ispitivanja, unapređenje regulatornih smjernica i propisa, povećana učestalost ispitivanja životinja i njihovih produkata.

6. ZAKLJUČAK

Mikotoksini se nalaze svuda oko nas, obzirom na ozbiljne posljedice koje mogu imati na žive organizme poput raka jetre, loših učinaka na mokraćno-spolni sustav te imunosupresiju, potrebno je ispitivati njihovu prisutnost u okolišu, a posebice u hrani. Rezultati brzog testa na aflatoksin M1 za uzorke s područja Primorsko – goranske i Sisačko – moslavačke županije su zadovoljavajući, iako su u uzorcima domaćih mlijeka detektirani aflatoksini. Reprerentativnost uzoraka i pregled područja bio bi bolji kad bi se testiralo više uzoraka, no ograničeni pristup proizvođačima mlijeka otežao je prikupljanje većeg broja različitih uzoraka.

AflaSensor nova test je precizan, daje jasne i brze podatke o uzorku kojeg se ispituje te se zbog svoje jednostavnosti može koristiti na terenu i tijekom prijema mlijeka u proizvodnju.

Za daljnji napredak u kontroliranju aflatoksina i drugih mikotoksina, zemlje u kojima su dopuštene veće količine mikotoksina u mlijeku i mliječnim proizvodima te slabije razvijene zemlje trebale bi u budućnosti imati mogućnost provedbe ovakvih brzih testiranja na aflatoksin, a to trebaju popratiti Zakoni o higijeni hrane i mikrobiološki kriteriji za hranu i pravilnici o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani ostalih zemalja izvan Europske unije. Osim mlijeka, preporučuje se testiranje stočne hrane na mikotoksine u svrhu prevencije stvaranja aflatoksina M1 u mlijeku.

7. LITERATURA

1. Havranek J, Tudor Kalit M, urednice. Sigurnost hrane: od polja do stola. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet; 2017. 93-111 str.
2. Samardžija M, Jeličić A, Mitak M, Pleadin J. Estrogeni učinci zearalenona u farmских životinja i opasnosti za zdravlje ljudi i životinja. Pregl Čl.
3. World Health Organization (WHO). Mycotoxins [Internet]. Geneva: WHO; 2018 [cited 2024 Aug 17]. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>
4. Cavaliere C, Foglia P, Guarino C, Marzioni F, Nazzari M, Samperi R, et al. Aflatoxin M1 determination in cheese by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2006;1143(1-2):193-199. doi:10.1016/j.chroma.2006.07.048
5. Pittet A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds—an updated review. *Revue Méd Vét*. 1998;149(6):479-492. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC164220/>
6. Wu F, Groopman JD, Pestka JJ. Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2014;5:351-372. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10610745/>
7. Ushkalov V, Danchuk V, Midyk S, Voloshchuk N, Danchuk O. Mycotoxins in milk and in dairy products. *Food science and technology*. 2020;14(3):137-149. DOI:<https://doi.org/10.15673/fst.v14i3.1786>
8. Muro-Cach CA, Stedeford T, Banasik M, Suchecki TT, Persad AS.** Mycotoxins: mechanisms of toxicity and methods of detection for identifying exposed individuals. **J Land Use Environ Law**. 2004;19(2):537-556. Dostupno na: <https://www.jstor.org/stable/42842854>
9. European Parliament and Council. Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. 2006 Dec 20;L364:5-24. Dostupno na: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX%3A32006R1881#ntr3-L_2006364HR.01001501-E0003
10. Narodne Novine. Zakon o hrani. *Narodne Novine*. 2009 Feb 20;No. 45/2009. Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2009_02_20_445.html

11. Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o hrani. *Narodne Novine*. 2012 Dec 12; No. 146/2012. Dostupno na: https://narodnenovine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2012_12_146_3162.html
12. Zdolec N, Hadžiosmanović M, Kozačinski L, Cvrtila Ž, Filipović I. Ostaci biološki štetnih tvari u mlijeku. *Mljekarstvo*. 2006;56(2):191-202.
13. Muhiyaldin, B.J.; Saari, N.; Meor Hussin, A.S. Review on the Biological Detoxification of Mycotoxins Using Lactic Acid Bacteria to Enhance the Sustainability of Foods Supply. *Molecules* 2020, 25, 2655. <https://doi.org/10.3390/molecules25112655>
14. Shabeer S, Asad S, Jamal A, Ali A. Aflatoxin contamination, its impact and management strategies: an updated review. *Toxins*. 2022;14(5):307. doi:10.3390/toxins14050307
15. Ministarstvo zdravlja. Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani. *Narodne novine* [internet]. 2012; (146):3162 [citirano 2024-08-21]. Dostupno na: https://narodnenovine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2012_12_146_3162.html
16. Wang SH, Yeh SH, Chen PJ. Androgen Enhances Aflatoxin-induced Genotoxicity and Inflammation to Liver Cancer in Male Hepatitis B Patients. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2023;15(2):507-508. doi: 10.1016/j.jcmgh.2022.11.001. Epub 2022 Nov 23. PMID: 36427539; PMCID: PMC9880974.
17. Europska komisija. Uredba Komisije (EU) br. 165/2010 od 26. veljače 2010. o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1881/2006 o određivanju maksimalnih razina određenih kontaminanata u hrani u pogledu aflatoksina. *Isključeno*. *J Eur Commun*. 2010;50:8–12
18. Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu. Označavanje, kontrola proizvodnosti i procjena uzgojnih vrijednosti ovaca i koza [Internet]. Zagreb: Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu; 2022. Dostupno na: <https://www.hapih.hr/wp-content/uploads/2022/02/Oznac%CC%8Cavanje-kontrola-proizvodnosti-i-procjena-uzgojnih-vrijednosti-ovaca-i-koza.pdf>
19. Quevedo-Garza, P.A.; Amador-Espejo, G.G.; Salas-García, R.; Ramos-Peña, E.G.; Trujillo, A.-J. Aflatoxin M₁ Determination in Infant Formulae Distributed in Monterrey, Mexico. *Toxins* 2020, 12, 100. <https://doi.org/10.3390/toxins12020100>
20. JoVE Science Education Database. Analytical Chemistry. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). JoVE, Cambridge, MA, (2023).

21. Ropejko K, Twarużek M. Zearalenone and Its Metabolites-General Overview, Occurrence, and Toxicity. *Toxins* (Basel). 2021 Jan 6;13(1):35. doi: 10.3390/toxins13010035. PMID: 33418872; PMCID: PMC7825134.
22. Pitt JI. Mycotoxins: Ochratoxin A. In: Motarjemi Y, editor. *Encyclopedia of Food Safety*. Academic Press; 2014. p. 304-309. ISBN 9780123786135. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00191-8>.
23. Pineda R, Sesan TE, Ferrer G, Ramos AJ, Sanchis V, Marín S. Impact of climate change on the accumulation of Fusarium mycotoxins in cereals: A review of the mechanisms. 2023;14:1204398. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10379110/>
24. PubChem. Ochratoxin A. [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information; 2024 [cited 2024 Aug 27]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/442530>
25. PubChem. Zearalenone. [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information; 2024 [cited 2024 Aug 27]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281576#section=Food-Additive-Classes>
26. Polak-Śliwińska M, Paszczyk B. Trichothecenes in Food and Feed, Relevance to Human and Animal Health and Methods of Detection: A Systematic Review. *Molecules*. 2021 Jan 16;26(2):454. doi: 10.3390/molecules26020454
27. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 4696, Patulin; [cited 2024 Aug 27]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Patulin>
28. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 186907, Aflatoxin B1; [cited 2024 Aug 29]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aflatoxin-B1>
29. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 2724360, Aflatoxin B2; [cited 2024 Aug 29]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aflatoxin-B2>
30. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): NCBI; [pristupljeno 2024 Sep 2]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284461>

31. PubChem [Internet]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=15558498&t=1> [pristupljeno 2024 Kol. 29].
32. Noack Group [Internet]. Dostupno na: <https://noackgroup.com/hr/product/heatsensor-duo/> [pristupljeno 02.09.2024.].
33. Noack Group [Internet]. Dostupno na: <https://noackgroup.com/hr/product/readsensor-2/> [pristupljeno 02.09.2024.].
34. Unisensor [Internet]. Dostupno na: <https://unisensor.be/assets/f4869fe4-e8d3-4114-8a81-52cdb98b2bd3/aflasensor-nova-kit041n-brochure.pdf> [pristupljeno 02.09.2024.].

ŽIVOTOPIS

Antonija Kevrić rođena je 21.05.2000.godine u Rijeci. U lipnju 2015.godine završila je osnovnu školu „Sveti Matej“ Viškovo. Svoje obrazovanje nastavlja u Gimnaziji Andrije Mohorovičića Rijeka, te u rujnu 2019.godine upisuje željeni Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Od stranih jezika aktivno se koristi engleskim jezikom, te posjeduje vozačku dozvolu B kategorije.