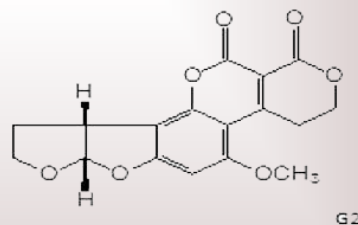
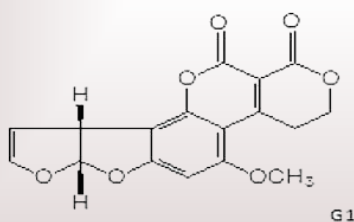
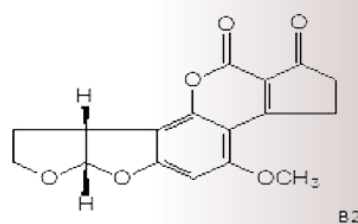
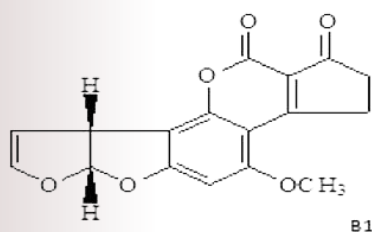


«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ
ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΜΕ ΤΗ ΤΕΧΝΙΚΗ ELISA»

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΛΠΙΔΑ ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ



ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2015

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ
ΣΕ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ELISA»**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΛΠΙΔΑ ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ

Εξεταστική επιτροπή: Καπόλος Ιωάννης (επιβλέπων)

Αγριοπούλου Σοφία (επιβλέπουσα)

..... (μέλος)

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στις ζωοτροφές, αλλά και στις πρώτες ύλες αυτών, μπορεί να υπάρχει έμμεσος κίνδυνος για την υγεία των καταναλωτών εξαιτίας της πιθανής ύπαρξης μιας ομάδας μυκοτοξινών. Πιο συγκεκριμένα, οι αφλατοξίνες (B1, B2, G1, G2) οι οποίες παράγονται από αφλατοξινογόνους μύκητες, προσβάλλουν τις κτηνοτροφικές καλλιέργειες κάτω από ορισμένες συνθήκες.

Στόχος της παρούσας μελέτης, ήταν να αναπτυχθεί μια γρήγορη μέθοδος ανίχνευσης των αφλατοξινών σε ζωοτροφές, να αξιολογηθεί η παρουσία αυτών και να διερευνηθούν τα πιθανά αίτια και οι εμπλεκόμενοι παράγοντες επικινδυνότητας για την εμφάνισή τους.

Στην εν λόγω μελέτη αναλύθηκαν συνολικά 45 δείγματα ζωοτροφών, εκ των οποίων τα 10 προερχόταν από την δυτική Ελλάδα, τα 13 από την βόρεια και τα 22 από την νότια Ελλάδα κατά τη διάρκεια Νοεμβρίου 2013 – Ιουνίου 2014. Τα δείγματα των ζωοτροφών αυτών, αναλύθηκαν με την εφαρμογή της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, προέκυψε πως από τα 45 δείγματα ζωοτροφών που αναλύθηκαν, σε κανένα από αυτά δεν ανιχνεύθηκαν αφλατοξίνες, καθώς οι τιμές των συγκεντρώσεων των αφλατοξινών που πήραμε ήταν πολύ χαμηλότερες του ορίου ανίχνευσης, το οποίο ήταν 1,75ppb. Συνολικά δεν βρέθηκαν δείγματα ζωοτροφών να υπερβαίνουν το ανώτατο επιτρεπτό όριο που έχει θεσπίσει η Ευρωπαϊκή νομοθεσία για το σύνολο των αφλατοξινών.

Η προαναφερθείσα εφαρμοσμένη μέθοδος αποτελεί μια γρήγορη, απλή και χαμηλού κόστους ανάλυση. Μπορεί να εφαρμοστεί όχι μόνο για την ποιοτική ανάλυση, με την ένδειξη θετικού ή αρνητικού αποτελέσματος, αλλά και για την ποσοτική, με τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του δείγματος και την σύγκριση αυτού με μια πρότυπη καμπύλη.

Λέξεις κλειδιά: Αφλατοξίνες, ELISA, Ζωοτροφή

ABSTRACT

For feeds, but also on those raw materials, may be an indirect health risk to consumers due to the possible existence of a group of mycotoxins. More specifically, aflatoxins (B1, B2, G1, G2) that produced by toxigenic fungi, that infect forage crops under certain conditions.

The aim of this study, was the develop of a rapid Immunosorbent method for the detection of aflatoxins in feed, to assess the presence and to investigate the possible causes and the involved risk factors for these.

This study involved a total of 45 samples of feed, which 10 of those came from western area, 13 from the north area and last 22 from the southern area of Greece during November 2013 – June 2014. Samples of these feed were analyzed by applying the Enzyme Immunoassay ELISA method for determination of aflatoxins.

According to the results of this study, from 45 feed samples that analyzed, no one of them found contaminated with Aflatoxins because their concentration are lower than the limit of detection that was 1,75ppb. Overall no feed samples were found to exceed the maximum limits that established by the legislation for total aflatoxins.

The applied method is fast, simple and low cost , which can be applied to qualitative analysis indicate positive or negative results, but also to quantitatively by measuring the optical absorption of the sample by comparing it with a standard curve .

Keywords: Aflatoxins, ELISA, feed

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ	4
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.....	5
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	5
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
2.1 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ.....	9
1.1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ.....	9
1.1.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ	9
1.1.3 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΖΩΩΝ	12
2.1.1 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΣΧΕΤΙΚΗ ΜΕ ΤΙΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ	13
1.1.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ.....	14
2.2 Η ΜΕΘΟΔΟΣ ELISA	15
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	19
2.1 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	19
2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ELISA.....	21
2.3 ΥΛΙΚΑ	23
2.4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	23
2.5 ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ	23
2.6 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	24
2.6.1 ΑΛΕΣΗ- ΕΚΧΥΛΙΣΗ.....	24
2.6.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ELISA	25
2.7 ΚΑΜΠΥΛΗ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ.....	28
2.8 ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	31
2.9 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ELISA	32
2.10 ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ.....	33
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	36
3.1 ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ.....	36
3.2 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ	43
3.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ELISA.....	44

3.4	ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	45
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	47
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	55
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1. ΟΔΗΓΙΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗ	56

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στα πλαίσια της πτυχιακής μου εργασίας, η οποία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο ενόργανης χημικής ανάλυσης του τμήματος τεχνολογίας τροφίμων του Τ.Ε.Ι Πελοποννήσου, με έδρα την Καλαμάτα του, συνέβαλαν στην εκπόνησή της σημαντικά και αξιόλογα άτομα στα οποία οφείλω να εκφράσω ευχαριστίες.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω λοιπόν, θερμά τον Καθηγητή Χημείας του Τ.Ε.Ι Πελοποννήσου κ. Καπόλο Ιωάννη και την κ. Αγριοπούλου Σοφία για την επιλογή του θέματος και την άριστη καθοδήγησή και εποπτεία τους σε όλα τα στάδια της πτυχιακής μου εργασίας.

Ευχαριστίες εκφράζω επίσης, στον Δρα. Καραμπάγια Ιωάννη, μέλος του ερευνητικού εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τις εύστοχες παρατηρήσεις του και στον κ. Χόβολο Ευάγγελο απόφοιτο της Φιλοσοφικής σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για τις συντακτικές επισημάνσεις του.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του εργαστηρίου Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης του Τ.Ε.Ι Πελοποννήσου, για την διάθεση του οργάνου Elisa, καθώς επίσης και των καταστημάτων γεωργικών ειδών, για την διάθεση των δειγμάτων ζωοτροφών.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

Ab antibody (Αντίσωμα)

AFB1, B2, G1, G2 Αφλατοξίνη B1, B2, G1, G2

AFs aflatoxins (Αφλατοξίνες)

AFM1 Αφλατοξίνη M1

Ag antigen (Αντιγόνο)

DON Deoxynivalenol (Δεσοξυνιβαλενόλη)

E.E Ευρωπαϊκή Ένωση/ Ευρωπαϊκή Επιτροπή

ELISA Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Ανοσοενζυμική δοκιμή)

GC Gas Chromatography (Αέρια χρωματογραφία)

HPLC High Performance Liquid Chromatography (Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης)

IARC International Agency for Research of Cancer (Διεθνής Οργανισμός Ερευνών για τον Καρκίνο)

Καν. Κανονισμός Ευρωπαϊκής Ένωσης

LC Liquid Chromatography (Υγρή χρωματογραφία)

LC-MS Liquid Chromatography – Mass spectrometry (Υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας)

LOD Limit of detection (Όριο ανίχνευσης)

LOQ Limit of quantification (Όριο ποσοτικοποίησης)

OTA Ochratoxin A (Ωχρατοξίνη Α)

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1: Πρότυπες καμπύλες ανάλυσης ELISA

Γράφημα 2: Πρότυπη καμπύλη ανάλυσης ELISA

Γράφημα 3: Πρότυπη καμπύλη δοκιμών ανάκτησης ELISA

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ορολογία ELISA^[72,73]

Πίνακας 2: Σύσταση δειγμάτων

Πίνακας 3: Συγκεντρώσεις προτύπων αφλατοξίνης

Πίνακας 4: Υπολογισμοί κατασκευής πρότυπης καμπύλης

Πίνακας 5: Παράδειγμα ποσοτικοποίησης με ELISA

Πίνακας 6: Αποτελέσματα δοκιμών ανάκτησης

Πίνακας 7: Ποσοτικοποίηση με ELISA

Πίνακας 8: Αποτελέσματα δειγμάτων

Πίνακας 9: Αποτελέσματα ανάλυσης ELISA

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα εξωφύλλου: Χημική δομή αφλατοξινών^[34]

Εικόνα 1: Χημική δομή αφλατοξινών^[34]

Εικόνα 2: Αραβόσιτος μολυσμένος από αφλατοξίνη^[42]

Εικόνα 3: Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση μυκοτοξινών στην τροφική αλυσίδα^[56]

Εικόνα 4: Συναγωνιστική ELISA^[76]

Εικόνα 5: Συσκευή ανάγνωσης ELISA^[77]

Εικόνα 6: Αραίωση και φύλαξη δειγμάτων^[78]

Εικόνα 7: Πλήρωση μικροπηγαδιών με διαλύματα προτύπων και δείγματος^[79]

Εικόνα 8: Προσθήκη διαλύματος “enzyme conjugate”^[79]

Εικόνα 9: Απομάκρυνση περιεχομένου σε απορροφητικό χαρτί^[79]

Εικόνα 10: Προσθήκη διαλύματος ‘Substrate/ Chromogen’^[79]

Εικόνα 11: Προσθήκη διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης^[78]

Εικόνα 12: Αλλαγή χρώματος – Τερματισμός αντίδρασης^[78]

Εικόνα 13: Προσθήκη διαλύματος τερματισμού^[78]

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μυκοτοξίνες, είναι δευτερογενείς μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους οι οποίες παράγονται κυρίως από μύκητες που ανήκουν στα γένη *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus* και *Penicillium* ^[1]. Η παραγωγή μυκοτοξινών μπορεί να συμβεί στο χωράφι, κατά τη διάρκεια της συγκομιδής, στην μεταφορά ή στην αποθήκευση και υπό ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας, παρουσία οξυγόνου και μυκητιακών σπορίων ^[2]. Οι πιο κοινές κατηγορίες που απαντούν στις ζωοτροφές περιλαμβάνουν τις αφλατοξίνες, την ωχρατοξίνη Α (OTA) και τις τριχοθισίνες ^[3]. Οι αφλατοξίνες (AFs) που παράγονται από τα είδη *Aspergillus*, αποτελούν μια οικογένεια που περιλαμβάνει τις αφλατοξίνες B1, B2, G1 και G2. Η αφλατοξίνη B1 (AFB1) βρίσκεται συνήθως στην υψηλότερη συγκέντρωση στις ζωοτροφές ^[4].

Στα ζώα, που τρέφονται με τροφές μολυσμένες από μυκοτοξίνες, μπορεί να προκληθεί οξεία τοξικότητα, ως αποτέλεσμα μεγάλης δόσης ή χρόνιας τοξικότητας, λόγω κατανάλωσης μολυσμένης ζωοτροφής ακόμα και σε μικρή συγκέντρωση. Τα ζώα που καταναλώνουν τροφές μολυσμένες από μυκοτοξίνες, έχουν ως άμεση συνέπεια την μείωση της κατανάλωσης τροφής αυτών, τη μείωση του ρυθμού αύξησης και ανάπτυξης τους και την μείωση αναπαραγωγής και αύξησης του βάρους τους ^[5,6].

Το πρόβλημα των μυκοτοξινών όμως δεν σταματά μόνο στα ζώα. Μια πιθανή παρουσία μυκοτοξινών στις ζωοτροφές, συνεπάγεται μια πιθανή μεταφορά τους και στα ζωικά προϊόντα, κυρίως στο γάλα, όπου μπορεί να αποτελέσει σοβαρή απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Λαμβάνοντας υπόψη τόσο τη μεταφορά των μυκοτοξινών κυρίως στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα και το σχετικό κίνδυνο για τους καταναλωτές των προϊόντων αυτών, όσο και τις αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία των ζώων, η Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε) έχει θεσπίσει κανονισμούς για τις AFs στις ζωοτροφές ^[7].

Η ανάλυση των AFs αποτελεί ένα δύσκολο έργο. Υπάρχουν καθορισμένες διαδικασίες για τον προσδιορισμό τους σε τρόφιμα όπως (πχ. η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Η αέρια χρωματογραφία (GC) και η υγρή χρωματογραφία (LC) ^[2,8] είναι οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών στα

τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Οι εν λόγω τεχνικές, παρότι παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια απαιτούν εκτεταμένη προετοιμασία του δείγματος, ακριβό εξοπλισμό και εξειδικευμένο προσωπικό ^[9].

Ένας αριθμός χημικών, βιολογικών και φυσικών μεθόδων, έχουν διερευνηθεί και χρησιμοποιηθεί για την προσπάθεια αδρανοποίησης των AFs σε τρόφιμα και ζωοτροφές ^[10]. Προσφάτως η μέθοδος ELISA (Enzyme - Linked ImmunoSorbent Assay) έγινε πολύ δημοφιλής στην ανίχνευση των μυκοτοξινών, λόγω του σχετικά χαμηλού κόστους και της εύκολης εφαρμογής της. Η ανάλυση αυτή, είναι μια ταχεία μέθοδος, κατάλληλη για αναλύσεις ρουτίνας και για την διαγνωστική εφαρμογή ανίχνευσης AFs που εξετάζουμε στην παρούσα μελέτη ^[11].

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ

1.1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ

Οι AFs, προσδιορίστηκαν για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1960, όταν πάνω από 100.000 γαλοπούλες πέθαναν στο Ηνωμένο Βασίλειο λόγω μολυσμένων ζωοτροφών που παράγονταν στη Βραζιλία. Η AFB1 βρέθηκε να είναι η αιτία της λεγόμενης ασθένειας «Turkey-X» και εν συνεχεία η έρευνα το ανέδειξε ως το ισχυρότερο φυσικό καρκινογόνο για τα ζώα ^[12].

Το ξέσπασμα της λεγόμενης νόσου (Turkey-X) σε γαλοπούλες στο Ηνωμένο Βασίλειο το 1960, δηλαδή περίπου 50 χρόνια πριν, ήταν το γεγονός που οδήγησε στον προσδιορισμό των AFs και στον πολλαπλασιασμό των ερευνών για την μόλυνση των τροφών και των ζωοτροφών από μυκοτοξίνες ^[13].

1.1.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ

Οι AFs, είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus* ^[14]. Το όνομα αφλατοξίνη, προέρχεται από το πρόθεμα ‘α’ από το *Aspergillus*, ‘φλα’ από το *flavus* και την λέξη ‘toxin’ που σημαίνει δηλητήριο ^[15]. Η παρουσία τους στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές, αποτελεί κίνδυνο για την υγεία των ανθρώπων και των ζώων ^[16]. Οι μεταβολίτες αυτοί έχουν υψηλή τοξικότητα, συμπεριλαμβανομένων των καρκινογόνων, τερατογόνων και μεταλλαξιογόνων ιδιοτήτων ^[17,18].

Ανάμεσα σε 20 είδη AFs, περιλαμβάνονται 4 είδη, οι B1, B2, G1 και G2 που εμφανίζονται συχνά στο φυσικό περιβάλλον ^[19]. Οι AFs B1, B2, G1 και G2 έχουν υψηλή τοξικότητα και αντίστοιχα οι B1 και G1 έχουν την υψηλότερη βιολογική τοξικότητα. Ο Διεθνής Οργανισμός Ερευνών για τον Καρκίνο (IARC) έχει ταξινομήσει την AFB1 ως την πρώτη ομάδα καρκινογόνων (για τον άνθρωπο) ^[20]. Η παρατεταμένη ξηρασία, οι υψηλές θερμοκρασίες, η σύνθεση του υποστρώματος, ο χρόνος και οι συνθήκες αποθήκευσης των προϊόντων, αναφέρονται ως κύριοι παράγοντες για την ανάπτυξη των μυκήτων και την παραγωγή των AFs ^[21]. Παρά το γεγονός ότι η μόλυνση των καλλιεργειών με AFs είναι ένα παγκόσμιο πρόβλημα, σε

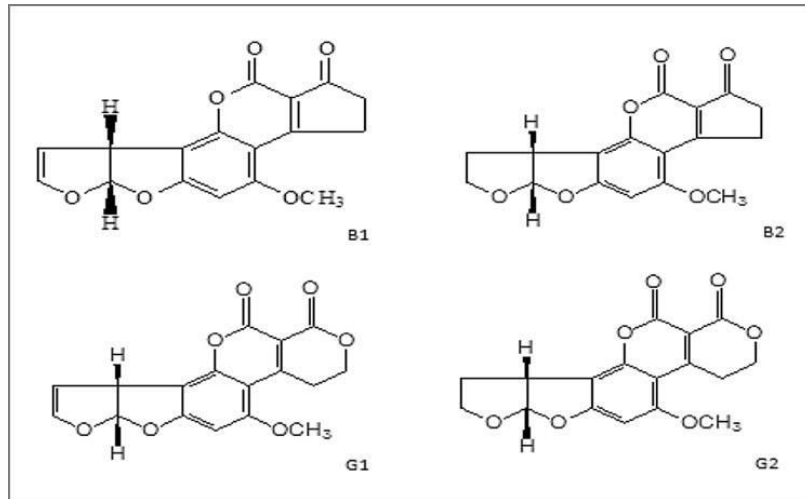
τροπικές και υποτροπικές περιοχές, η ανάπτυξη των AFs είναι πιο έντονη από ότι στις εύκρατες περιοχές ^[22].

Στην πραγματικότητα, αποδείχθηκε ότι ανήκουν στις πιο ισχυρές νεφροτοξικές φυσικές ενώσεις και καρκινογόνες ουσίες που προσβάλλουν το συκώτι και ως φυσικό επακόλουθο, προσέλκυσαν την ιδιαίτερη προσοχή προς μελέτη από τον πρώτο προσδιορισμό τους στις αρχές της δεκαετίας του '60' ^[23].

Οι AFs, μπορούν να βρεθούν σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων και ζωοτροφών λόγω αόρατης φθοράς στις καλλιέργειες των φυτών, τη συγκομιδή, την αποθήκευση και επεξεργασία αυτών. Υποστηρίζεται, ότι περίπου το 20% των προϊόντων διατροφής (κυρίως φυτικής προέλευσης), είναι ουσιαστικά μολυσμένα από αυτές ^[24]. Οι ισχυρά τοξικές και καρκινογόνες AFs, αναπτύσσονται κυρίως σε σιτηρά (καλαμπόκι, σιτάρι), ξηρούς καρπούς (φιστίκια, αμύγδαλα), ξηρά φρούτα (σύκα, βερίκοκα), μπαχαρικά και τυριά ^[25].

Χημικά, οι AFs είναι φθορίζουσες ετεροκυκλικές ενώσεις, που αποτελούνται από τμήματα διϋδροδιφουρανίου και τετραϋδροδιφουρανίου, συγχωνευμένα στο μόριο της κουμαρίνης ^[26]. Η χημική τους δομή παρουσιάζεται στην εικόνα 1.

Οι AFs, έχουν προσδιορισθεί με διάφορες αναλυτικές μεθόδους, όπως είναι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης HPLC καθώς και η υγρή χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματομετρία μάζας LC-MS ^[27,28, 29, 30, 31]. Ωστόσο, η ανάγκη για ταχείες μεθόδους ανάλυσης, οδήγησε στην χρήση μεθόδων, όπως οι ανοσολογικές δοκιμές. Η δοκιμασία ELISA έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην έρευνα των AFs, λόγω ευαισθησίας, εκλεκτικότητας, ταχύτητας, ευκολίας και χαμηλού κόστους, χρησιμοποιώντας αντισώματα ειδικά για την ανίχνευση μυκοτοξινών στα τρόφιμα ^[32, 33].



Εικόνα 1. Χημική δομή αφλατοξινών

Οι πρώτες ύλες των ζωοτροφών μολύνονται συχνά με μυκοτοξίνες. Οι κύριες κατηγορίες των μυκοτοξινών που προσβάλλουν τις ζωοτροφές είναι οι AFs, η δεσοξυनिβαλενόλη (DON) και άλλες τριχοθηκίνες, ζεαραλενόνη, φουμονισίνη, ωχρατοξίνη Α, και αλκαλοειδή ^[35]. Οι μυκητολογικές μολύνσεις των ζωοτροφών, είναι συχνά το αποτέλεσμα μιας ακατάλληλης διαδικασίας παραγωγής, μεταποίησης, αποθήκευσης, διανομής και τροφοδότησης αυτών. Είναι γνωστό ότι η ανάπτυξη μυκήτων επηρεάζεται επίσης από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι μυκοτοξικώσεις στα ζώα έχουν γίνει ένα παγκόσμιο ζήτημα, μιας και παρατηρείται αυξανόμενη ανησυχία για τις επιπτώσεις των μυκοτοξινών στην υγεία των ζώων και στην ευημερία αυτών ^[36, 37].

Η μόλυνση των ζωοτροφών από μυκοτοξίνες μπορεί να επιφέρει κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία, καθώς αυτές εμφανίζονται στον ιστό, το σώμα και τα υγρά των ζώων ^[38]. Εάν η συγκέντρωσή τους στις ζωοτροφές υπερβαίνει ένα ορισμένο επίπεδο, προκαλούνται σοβαρές δυσμενείς επιπτώσεις στο ζωικό βασίλειο, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται, τόσο η μείωση της σωματικής αύξησης, η ανοσοκαταστολή και τα προβλήματα γονιμότητας, όσο και ο θάνατος ^[39, 40, 41]. Ενδεικτικά στην εικόνα 2^[45] παρουσιάζεται αραβόσιτος ο οποίος έχει μολυνθεί με AFs.



Εικόνα 2: Αραβόσιτος προσβεβλημένος από αφλατοξίνη.

1.1.3 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΖΩΩΝ

Οι AFs αποτελούν έναν ιδιαίτερο κίνδυνο λόγω της εκτεταμένης εμφάνισης και τοξικότητάς τους ^[43]. Η έκθεση του ανθρώπου στις μυκοτοξίνες προκύπτει από την κατανάλωση τροφίμων φυτικής προέλευσης μολυσμένα με τοξίνες και η μεταφορά των μυκοτοξινών και των μεταβολιτών τους σε ζωικά προϊόντα όπως το γάλα, το κρέας και τα αυγά ^[44]. Οι AFs, είναι οι περισσότερο επικίνδυνες μυκοτοξίνες για τη δημιουργία σοβαρών προβλημάτων υγείας στον άνθρωπο. Όπως και τα υπόλοιπα τοξικολογικά σύνδρομα, τα επίπεδα μόλυνσης από AFs μπορεί να χαρακτηριστούν ως οξεία ή χρόνια. Η χρόνια τοξικότητα χαρακτηρίζεται μέσω της έκθεσης σε χαμηλή δόση για μεγάλο χρονικό διάστημα, κάτι που οδηγεί σε καρκίνο και άλλες μη αναστρέψιμες βλάβες. Η οξεία τοξικότητα των AFs, παρουσιάζει ταχεία εκδήλωση και μια προφανής τοξική αντίδραση ^[46]. Η ημερήσια πρόσληψη AFs σε χαμηλές δόσεις επί ένα συνεχές χρονικό διάστημα, μπορεί να προκαλέσει χρόνιες αφλατοξικώσεις με αποτέλεσμα τη μειωμένη κατανάλωση τροφής, την καχεκτική ανάπτυξη, την ανοσοκαταστολή και την πιθανή ανάπτυξη καρκίνου του ήπατος ^[47].

Αναφορικά με την παιδική υγεία, έχει αναφερθεί ότι οι AFs σχετίζονται με την εμφάνιση ίκτερου σε νεογνά, αλλά και με την καθυστέρηση της ανάπτυξής τους. Η αφλατοξίκωση εμπλέκεται τόσο στο σύνδρομο Kwashiorkor, μια νόσος υποσιτισμένων παιδιών στη Βόρεια Αφρική, αλλά και με το σύνδρομο Reye, μια ηπατοεγκεφαλοπάθεια σε παιδιά στην Ινδία, Τσεχοσλοβακία και Νέα Ζηλανδία ^[48].

Όταν τα ζώα καταναλώνουν τροφές οι οποίες έχουν μολυνθεί με AFs, η AFB1 μπορεί να μεταβολιστεί σε υδροξυλιωμένο μεταβολίτη, την λεγόμενη αφλατοξίνη M1 (AFM1). Η AFM1 μπορεί να βρεθεί σε ένα ευρύ φάσμα γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως είναι το νωπό γάλα, το αποβουτυρωμένο γάλα, το γιαούρτι και το τυρί ^[49].

Το όργανο 'στόχος' στα ζώα, μετά την πρόσληψη AFs είναι το ήπαρ, όπου προκαλούνται ηπατοκυτταρικές βλάβες. Μακροχρόνια έκθεση ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις AFs, μπορεί να οδηγήσει σε ηπατική ίνωση και όγκους στα ηπατοκύτταρα. Γενικά, τα κλινικά συμπτώματα ποικίλουν ανάλογα με το ποσοστό έκθεσης και αφορούν ανορεξία, ίκτερο, κατάθλιψη, απώλεια βάρους, ρινική καταρροή, γαστρεντερικές διαταραχές και πνευμονικό οίδημα. Οι επιδράσεις των AFs στην υγεία των ζώων, εκδηλώνονται με μια σειρά συμπτωμάτων, που εξαρτώνται κυρίως από τη λαμβανόμενη ποσότητα των AFs, τη διάρκεια έκθεσης, το είδος και την ηλικία του ζώου, το φύλο, τη θρεπτική κατάσταση και τη διατροφή του συνολικά ^[49, 50, 51].

2.1.1 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΣΧΕΤΙΚΗ ΜΕ ΤΙΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ

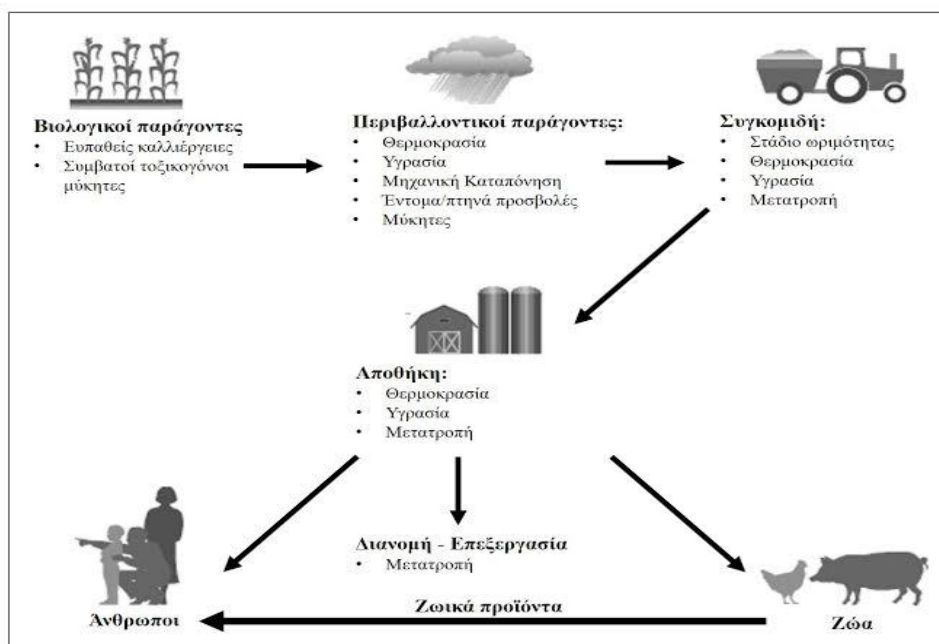
Η Ευρωπαϊκή Νομοθεσία, κατατάσσει τις AFs στις ανεπιθύμητες ουσίες για τις ζωοτροφές. Τα ανώτατα επιτρεπτά επίπεδα των AFs στις ζωοτροφές, έχουν θεσμοθετηθεί από την Ε.Ε με τον Κανονισμό 574/2011, όπως τροποποιήθηκε και ισχύει. Ωστόσο, η Ε.Ε έχει θεσπίσει όρια μόνο για την AFB1, οι τιμές της οποίας διαφέρουν ανάλογα με τη φύση του υποστρώματος και τον προορισμό της ζωοτροφής.

Συγκεκριμένα τα όρια της AFB1 για τις πρώτες ύλες των ζωοτροφών, ανέρχονται στα 0,02mg/kg (ppm) ή 200μg/kg (ppb) αντίστοιχα, για τις συμπληρωματικές και πλήρεις ζωοτροφές στα 0,01ppm εκτός από: σύνθετες

ζωοτροφές για βοοειδή γαλακτοπαραγωγής και μόσχους, πρόβατα γαλακτοπαραγωγής και αμνούς, αίγες γαλακτοπαραγωγής και ερίφια, χοιρίδια και κοτόπουλα στα οποία ανέρχεται στα 0,005ppm. Αντίστοιχα, για τις σύνθετες ζωοτροφές για βοοειδή, πρόβατα, αίγες, χοίρους και πουλερικά εκτός από τα αντίστοιχα ζώα γαλακτοπαραγωγής και τα νεαρά μικρά αυτών τα όρια ανέρχονται στα 0,02ppm ^[53].

1.1.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ

Τόσο η ανάπτυξη μυκήτων, όσο και η παραγωγή AFs, εξαρτάται από μια ποικιλία φυσικών, χημικών και βιολογικών παραγόντων [54]. Λαμβάνοντας υπόψη ότι υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη της μόλυνσης από μυκοτοξίνες (εικόνα 3.), το κλίμα είναι και ο πιο σημαντικός από αυτούς ^[55].



Εικόνα 3. Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση μυκοτοξινών στην τροφική αλυσίδα

Η παραγωγή AFs εμφανίζεται κυρίως σε περιοχές με τροπικά και υποτροπικά κλίματα ^[57]. Οι κλιματικές συνθήκες μιας περιοχής, επηρεάζουν τόσο την ανάπτυξη των μυκήτων, όσο και την παραγωγή μυκοτοξινών πριν τη συγκομιδή, κατά τη

συγκομιδή και κατά την αποθήκευση των ζωοτροφών ^[58]. Η θερμοκρασία ανάπτυξης των μυκήτων είναι από 12°C έως 48°C, ενώ οι ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης τους κυμαίνονται από 36°C έως 38°C. Η παραγωγή των AFs παρατηρείται όταν οι θερμοκρασίες κυμαίνονται μεταξύ 20°C και 30°C ^[59]. Χώρες που παρουσιάζουν θερμοκρασίες άνω των 30 °C, χαρακτηρίζονται επικίνδυνες για την παραγωγή AFs ^[60] σε συνδυασμό και με την εμφάνιση θερμοανθεκτικών μυκήτων ^[58], καθώς η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης και παραγωγής τοξινών των ειδών *A. flavus* και *A. parasiticus* είναι 25°C έως 35° και 28°C έως 30° αντίστοιχα ^[62].

Ακόμη και αν οι γεωκλιματικές συνθήκες αποτελούν τον σημαντικότερο παράγοντα για την εμφάνιση AFs, υπάρχουν και πολλοί άλλοι παράγοντες που εμπλέκονται όπως είναι η ποικιλία κτηνοτροφικών φυτών που καλλιεργούνται, η εναλλαγή των καλλιεργειών, ο χρόνος σποράς κ.α.^[63]. Ζωοτροφές υψηλού κινδύνου για την παρουσία AFs θεωρούνται το καλαμπόκι, το σιτάρι, η βρώμη, το κριθάρι, η σίκαλη και η βαμβακόπιτα, ενώ η σόγια θεωρείται σχετικά ανθεκτική ^[64, 65, 66].

Εκτός από τους προσυλλεκτικούς χειρισμούς των κτηνοτροφικών φυτών, σημαντικό ρόλο στην παρουσία αφλατοξινογόνων μυκήτων διαδραματίζουν οι χειρισμοί κατά την συλλογή και επεξεργασία των φυτών, αλλά και οι χειρισμοί κατά την αποθήκευση ^[67]. Για παράδειγμα, το καλαμπόκι και το ενσίρωμα καλαμποκιού, θεωρούνται από τις πιο επικίνδυνες ζωοτροφές για την παρουσία AFs, λόγω της ευαισθησίας τους κατά την αποθήκευση ^[68].

2.2 Η ΜΕΘΟΔΟΣ ELISA

Η μέθοδος ELISA, στηρίζεται στην εξειδικευμένη αντίδραση αντιγόνου (ag) – αντισώματος (ab) και επιτρέπει τόσο τον ποιοτικό, όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων πρωτεϊνών, που κατά την πειραματική διαδικασία ενέχουν το ρόλο του αντιγόνου. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ELISA, (sandwich ELISA, indirect ELISA, competitive ELISA), οι οποίοι βασίζονται στην ίδια αρχή και επιτρέπουν την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του αντιγόνου ή του αντισώματος.

Ο κάθε τύπος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποιοτική εκτίμηση, δηλαδή για τον εντοπισμό της ύπαρξης του ag ή του ab ή με τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης, βασισμένης σε γνωστές συγκεντρώσεις ag ή ab, να επιτευχθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του δείγματος.

Η έμμεση ανταγωνιστική μορφή της ELISA, χρησιμοποιεί την ανταγωνιστικότητα μεταξύ των ελεύθερων AFs που υπάρχουν στο διάλυμα και των ακινητοποιημένων, για τη σύνδεση του επισημασμένου με χρώμα ab, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η ποσοτικοποίηση του δείγματος σε μυκοτοξίνη. Αυτή η ανταγωνιστική τεχνική, οδηγεί σε μια μείωση του σήματος της απορρόφησης, με αυξανόμενη συγκέντρωση των ελεύθερων AFs του δείγματος ^[69].

Η ELISA ανταγωνιστικού τύπου, παρέχει μια άλλη εξαιρετική ευαίσθητη παραλλαγή για τη μέτρηση των ποσοτήτων του ag. Σε αυτή την τεχνική, το ab επωάζεται πρώτα σε διάλυμα δείγματος που περιέχει ag. Στη συνέχεια στο μίγμα ag – ab προστίθεται σε κελιά μικροτιτλοδοτήσεως επικαλυμμένα με ag. Όσο περισσότερο ag υπάρχει στο αρχικό διάλυμα – δείγμα, τόσο λιγότερο ελεύθερο ab θα υπάρχει διαθέσιμο, για να συνδεθεί με το επικαλυπτόμενο ag των κελιών. Μετά την έκπλυση του μη δεσμευμένου ab, ένα συζευγμένο ένζυμο Ab2 ειδικό για τον ισότυπο του Ab1 μπορεί να προστεθεί για τον προσδιορισμό της δεσμευμένης ποσότητας του Ab1 στο μικροπηγάδι. Στην ανταγωνιστική μέθοδο, όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ag στο αρχικό σήμα, τόσο μικρότερο είναι στο τελικό σήμα ^[70, 71]. Οι βασικές έννοιες σχετικά με την εφαρμογή της μεθόδου ELISA και την εξαγωγή αποτελέσματος παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

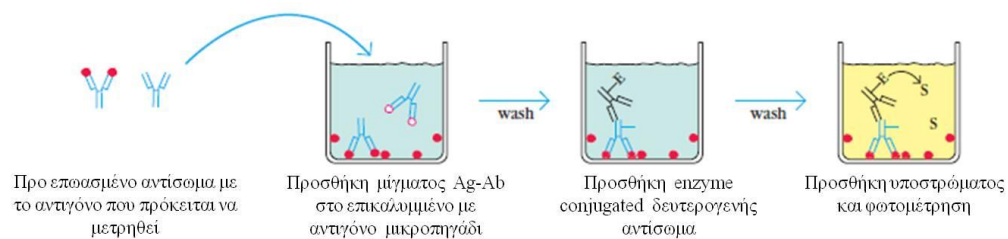
Ορολογία	Σημασία
Σταθερή φάση	Πλάκα κυψελίδων μικροπιλοδότησης. Ειδικά κατασκευασμένες πλάκες ELISA με 12 στήλες x 8 σειρές κυψελίδων.
Προσρόφηση	Η διαδικασία της προσθήκης αντιγόνου ή αντισώματος αραιωμένου σε ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να προσκολλάται παθητικά στη στερεή φάση κατά την επίωση.
Πλύση	Πλήρωση και εκκένωση των κυψελίδων με ρυθμιστικό διάλυμα για διαχωρισμό δεσμευμένων από μη δεσμευμένα αντιδραστήρια της ELISA. Πραγματοποιείται με το χέρι ή σε συσκευές πλύσης πλακών ELISA.
Αντιγόνα	Κάθε ουσία που εισερχόμενη σε ένα οργανισμό, μπορεί να προκαλέσει παραγωγή αντισωμάτων. Τα αντισώματα αντιδρούν με συγκεκριμένα αντιγόνα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευσή των αντιγόνων.
Αντισώματα	Παράγονται σε αντιγονικούς ερεθισμούς. Είναι πρωτεϊνικής φύσης και είναι εξειδικευμένα για συγκεκριμένα αντιγόνα.
Αντί- αντισώματα	Παράγονται όταν πρωτεΐνες (συμπεριλαμβανομένων και των αντισωμάτων) ενός είδους εισάγονται σε άλλο είδος. Για παράδειγμα, ορός ινδικού χοιριδίου σε κουνέλι, προκαλεί παραγωγή αντί -αντισωμάτων κουνελιού - ινδικού χοιριδίου.
Ένζυμο	Μια ουσία, που μπορεί να λειτουργήσει ακόμα και σε χαμηλή συγκέντρωση ως καταλύτης, προκειμένου να προωθήσει μια συγκεκριμένη αντίδραση. Διάφορα ειδικά ένζυμα χρησιμοποιούνται συνήθως στην ELISA, με τα σχετικά τους υποστρώματα.
Συζευγμένο ένζυμο	Ένα ένζυμο που είναι σταθερά συνδεδεμένο σε μια πρωτεΐνη, συνήθως σε ένα αντίσωμα (π.χ. ένα αντί-ειδικό αντίσωμα κουνελιού αντί-ινδικού χοιριδίου συζευγμένο με υπεροξειδάση χρένου).
Υπόστρωμα	Μια χημική ένωση με την οποία ένα ένζυμο αντιδρά με συγκεκριμένο τρόπο. Η αντίδραση αυτή χρησιμοποιείται για να παράγει σήμα, που διαβάζεται ως αλλαγή χρώματος του υποστρώματος.
Διακοπή	Η διαδικασία σταματάει με τη δράση ενός ενζύμου σε ένα υπόστρωμα, που έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή κάθε περαιτέρω αλλαγής στο χρώμα του.
Μέτρηση	Το χρώμα που παράγεται στην ELISA μετρείται ποσοτικά με τη χρήση ειδικών φασματόμετρων σε συγκεκριμένα μήκη κύματος για την προς ανίχνευση ουσία.
Καμπύλη αναφοράς	Με βάση τις απορροφήσεις των πρότυπων διαλυμάτων δημιουργείται καμπύλη αναφοράς, βάσει της οποίας ποσοτικοποιείται η προς ανίχνευση ουσία.

Πίνακας 1. Ορολογία ELISA

Ταχείς μέθοδοι, οι οποίες βασίζονται σε ανοσοχημικές τεχνικές, έχουν το πλεονέκτημα ότι δεν απαιτούν στάδια καθαρισμού ή στάδια εμπλουτισμού της αναλυόμενης ουσίας. Η ELISA είναι μια τεχνική η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για

το γρήγορο έλεγχο των περισσότερων μυκοτοξινών, ειδικά για τον έλεγχο των πρώτων υλών [74,75].

Στην παρούσα μελέτη, η μέθοδος ELISA που χρησιμοποιήθηκε ήταν συναγωνιστικού τύπου (competitive ELISA). Η διαφορά οφείλεται στο γεγονός ότι στα κελιά (wells) υπάρχει ήδη δεσμευμένη γνωστή ποσότητα ag (coating), ίδιου με το προς ανίχνευση ag των δειγμάτων, προκαλώντας, έτσι, το συναγωνισμό για τις θέσεις δέσμευσης του ab (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Συναγωνιστική ELISA

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Στην παρούσα μελέτη, από το σύνολο των 45 δειγμάτων ζωοτροφών που συμμετείχαν στην έρευνα, τα 10 από αυτά (22,2%) προερχόταν από την περιοχή της δυτικής Ελλάδας, τα 13 (28,8%) προερχόταν από την περιοχή της βόρειας Ελλάδας και τέλος τα 22 (51,1%) από την περιοχή της νότιας Ελλάδας. Τα δείγματα των ζωοτροφών για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης, συλλέχθηκαν συγκεκριμένα από τις περιοχές της Μεσσηνίας (Καλαμάτα, Μεσσήνη), της Θεσπρωτίας, της Πρέβεζας και της Ημαθίας. Όλα τα δείγματα και η σύσταση αυτών παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα 2.

Πίνακας 2: Σύσταση δειγμάτων

<u>ΔΕΙΓΜΑ</u>	<u>ΖΩΟΤΡΟΦΗ</u>	<u>ΚΩΔΙΚΟΣ</u>	<u>ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ</u>	<u>ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ</u>	<u>ΠΡΟΟΡΙΣΜΟΣ</u>
1	ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ	Σ1	ΑΛΕΣΜΕΝΟ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ, ΣΙΤΑΡΙ, ΚΡΙΘΑΡΙ	ΧΟΙΡΙΝΑ (ΜΕΓΑΛΕΣ ΜΑΝΕΣ)
2	ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ	Σ2	ΑΛΕΣΜΕΝΟ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ, ΣΙΤΑΡΙ, ΚΡΙΘΑΡΙ	ΜΙΚΡΑ ΧΟΙΡΙΝΑ
3	ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ	Σ3	ΑΛΕΣΜΕΝΟ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ, ΣΙΤΑΡΙ, ΚΡΙΘΑΡΙ	ΧΟΙΡΙΝΑ (ΜΑΝΕΣ ΠΟΥ ΔΕΝ ΓΕΝΝΗΣΑΝ)
4	ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ	Σ4	ΑΛΕΣΜΕΝΟ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ, ΣΙΤΑΡΙ, ΚΡΙΘΑΡΙ	ΧΟΙΡΙΝΑ (ΧΟΙΡΙΔΙΑ ΑΠΟ 30-60 kg)
5	ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ	Σ5	ΑΛΕΣΜΕΝΟ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ, ΣΙΤΑΡΙ, ΚΡΙΘΑΡΙ	ΧΟΙΡΙΝΑ (ΧΟΙΡΙΔΙΑ ΑΠΟ 60kg ΓΙΑ ΣΦΑΓΗ)
6	ΠΤΕΡΑΛΕΥΡΟ	Π	ΑΛΕΣΜΕΝΟ	ΠΤΕΡΑΛΕΥΡΟ	ΧΟΙΡΙΝΑ
7	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ (2013)	Κ1	ΦΥΣΙΚΗ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	ΧΟΙΡΙΝΑ
8	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ (2013)	Κ2	ΦΥΣΙΚΗ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	ΧΟΙΡΙΝΑ
9	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ ΑΛΛΟΙΩΜΕΝΟ (2012)	Κ3	ΦΥΣΙΚΗ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	ΧΟΙΡΙΝΑ
10	ΚΡΙΘΑΡΙ (2013)	Κ4	ΦΥΣΙΚΗ	ΚΡΙΘΑΡΙ	ΧΟΙΡΙΝΑ
11	ΚΡΙΘΑΡΙ (2013)	Κ5	ΦΥΣΙΚΗ	ΚΡΙΘΑΡΙ	ΧΟΙΡΙΝΑ
12	ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	Κ6	ΜΕΡΙΚΩΣ ΑΛΕΣΜΕΝΟ	ΣΟΓΙΑ	ΧΟΙΡΙΝΑ
13	ΣΙΤΑΡΙ (2012)	Κ7	ΦΥΣΙΚΗ	ΣΙΤΑΡΙ	ΧΟΙΡΙΝΑ
14	ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩ	16	ΑΛΕΣΜΕΝΟ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ,ΚΡΙΘ	ΑΓΓΟΠΡΟΒΑΤΑ

	ΓΗΣ ΑΙΓΟΠΡΟΒΑΤΩΝ			ΑΡΙ,ΣΟΓΙΑ	ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩ ΓΗ
15	ΧΩΡΙΚΗΣ ΠΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑΣ	13B	ΑΛΕΣΜΕΝΟ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ, ΚΡΙΘΑΡΙ, ΠΥΤΙΡΟ ΣΙΤΟΥ	ΧΩΡΙΚΑ ΠΤΗΝΑ
16	ΠΑΧΥΝΣΗΣ ΜΟΣΧΑΡΙΩΝ	15	ΑΛΕΣΜΕΝΟ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ, ΚΡΙΘΑΡΙ, ΣΟΓΙΑ	ΜΟΣΧΑΡΙΑ ΠΡΟΣ ΠΑΧΥΝΣΗ
17	ΠΑΧΥΝΣΕΩΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΟΥΝΕΛΙΩΝ	22	ΚΟΚΚΟΥΣ	ΤΡΙΦΥΛΛΙ, ΚΡΙΘΑΡΙ, ΠΙΤΥΡΑ ΣΙΤΟΥ, ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	ΠΑΧΥΝΟΜΕΝΑ ΚΟΥΝΕΛΙΑ
18	ΠΑΧΥΝΣΗΣ ΧΟΙΡΩΝ	20	ΑΛΕΣΜΕΝΟ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ, ΚΡΙΘΑΡΙ, ΣΟΓΙΑ ΠΥΤΙΡΟ ΣΙΤΟΥ	ΧΟΙΡΟΙ ΠΡΟΣ ΠΑΧΥΝΣΗ
19	ΠΑΧΥΝΣΗΣ ΑΜΝΟΕΡΙΦΙΩΝ	17	ΑΛΕΣΜΕΝΟ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ,ΚΡΙΘ ΑΡΙ, ΓΑΛΑ, ΣΟΓΙΑ	ΑΜΝΟΕΡΙΦΙΑ ΠΡΟΣ ΠΑΧΥΝΣΗ
20	ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ & ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΟΥΝΕΛΙΩΝ	22**	ΚΟΚΚΟΥΣ	ΤΡΙΦΥΛΛΙ, ΚΡΙΘΑΡΙ, ΒΡΩΜΗ, ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ, ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝ ΩΝ ΠΑΧΥΝΟΜΕΝΩΝ ΚΟΥΝΕΛΙΩΝ
21	ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓ ΗΣ ΠΟΥΛΕΡΙΚΩΝ	18	ΑΛΕΣΜΕΝΟ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ, ΣΟΓΙΑ	ΠΟΥΛΕΡΙΚΑ
22	ΜΙΓΜΑ ΧΟΙΡΙΔΙΩΝ	23	ΑΛΕΣΜΕΝΟ	ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ, ΠΥΤΙΡΑ ΣΙΤΟΥ	ΧΟΙΡΙΝΑ
23	ΟΙΚΟΣΙΤΩΝ ΖΩΩΝ	13	ΑΛΕΣΜΕΝΟ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ, ΚΡΙΘΑΡΙ, ΣΟΓΙΑ, ΠΥΤΙΡΟ ΣΙΤΟΥ	ΟΙΚΟΣΙΤΑ ΖΩΑ
24	ΠΑΧΥΝΣΕΩΣ ΑΜΝΟΕΡΙΦΙΩΝ	31	ΚΟΚΚΟΥΣ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ, ΚΡΙΘΑΡΙ, ΠΙΤΥΡΑ ΣΙΤΟΥ	ΑΜΝΟΕΡΙΦΙΑ ΠΡΟΣ ΠΑΧΥΝΣΗ
25	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ (Α.Σ)	-	ΦΥΣΙΚΗ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	ΓΕΝΙΚΗ ΧΡΗΣΗ
26	ΜΙΓΜΑ	-	ΑΛΕΥΡΩΔΗΣ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	ΜΙΚΡΑ ΚΟΤΟΠΟΥΛΑ
27	ΚΟΥΝΕΛΟΤΡΟΦΗ (ΠΡΕΒΕΖΑ)	-	ΚΟΚΚΟΙ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	ΚΟΥΝΕΛΙΑ
28	ΜΙΓΜΑ	-	ΜΕΡΙΚΩΣ ΑΛΕΣΜΕΝΟ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	ΜΕΓΑΛΑ ΚΟΤΟΠΟΥΛΑ
29	ΠΥΤΙΡΑ ΣΙΤΟΥ ΨΙΛΑ	-	ΑΛΕΥΡΩΔΗΣ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	ΜΙΚΡΑ ΚΟΤΟΠΟΥΛΑ Α΄ΗΛΙΚΙΑΣ
30	ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ ΓΙΑ ΧΟΙΡΟΥΣ	-	ΑΛΕΥΡΩΔΗΣ	ΣΙΤΑΡΙ	ΧΟΙΡΟΙ
31	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ (ΠΡΕΒΕΖΑ)	-	ΦΥΣΙΚΗ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	ΓΕΝΙΚΗ ΧΡΗΣΗ
32	ΚΟΥΝΕΛΟΤΡΟΦΗ (ΘΕΣΠΡΩΤΙΑ)	-	ΚΟΚΚΟΙ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	ΚΟΥΝΕΛΙΑ
33	ΚΟΥΝΕΛΟΤΡΟΦΗ (ΠΡΕΒΕΖΑ)	-	ΚΟΚΚΟΙ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	ΚΟΥΝΕΛΙΑ

34	ΜΙΓΜΑ	-	ΑΛΕΥΡΩΔΗΣ	ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ	ΜΙΚΡΑ ΚΟΤΟΠΟΥΛΑ
35	ΦΥΡΑΜΑ	-	ΦΥΣΙΚΗ	ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ	ΓΕΝΙΚΗ ΧΡΗΣΗ
36	ΣΙΤΑΡΙ	-	ΦΥΣΙΚΗ	ΣΙΤΑΡΙ	ΓΕΝΙΚΗ ΧΡΗΣΗ
37	ΣΟΓΙΑ	-	ΦΥΣΙΚΗ	ΣΟΓΙΑ	ΓΕΝΙΚΗ ΧΡΗΣΗ
38	ΜΙΓΜΑ	-	ΑΛΕΣΜΕΝΗ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ, ΠΥΤΙΡΑ ΣΙΤΟΥ	ΓΕΝΙΚΗ ΧΡΗΣΗ
39	ΚΟΥΝΕΛΟΤΡΟΦΗ	-	ΚΟΚΚΟΙ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ, ΠΥΤΙΡΑ ΣΙΤΟΥ	ΚΟΥΝΕΛΙΑ
40	ΒΡΩΜΗ	-	ΦΥΣΙΚΗ	ΒΡΩΜΗ	ΓΕΝΙΚΗ ΧΡΗΣΗ
41	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ ΟΛΟΚΛΗΡΟ	-	ΦΥΣΙΚΗ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	ΓΕΝΙΚΗ ΧΡΗΣΗ
42	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	-	ΜΕΡΙΚΩΣ ΑΛΕΣΜΕΝΟ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	ΓΕΝΙΚΗ ΧΡΗΣΗ
43	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	-	ΕΛΑΦΡΩΣ ΑΛΕΣΜΕΝΟ	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	ΓΕΝΙΚΗ ΧΡΗΣΗ
44	ΚΡΙΘΑΡΙ	-	ΦΥΣΙΚΗ	ΚΡΙΘΑΡΙ	ΓΕΝΙΚΗ ΧΡΗΣΗ
45	ΣΙΤΑΡΙ ΜΑΛΑΚΟ	-	ΦΥΣΙΚΗ	ΣΙΤΑΡΙ	ΓΕΝΙΚΗ ΧΡΗΣΗ

Η σύσταση των δειγμάτων, ποικίλει ανάλογα με το δείγμα και τη γεωγραφική περιοχή. Ωστόσο, τα 29 από τα 45 δείγματα που αναλύθηκαν στην έρευνα αυτή, είχαν ως βάση τον αραβόσιτο, ο οποίος σύμφωνα με βιβλιογραφικές πηγές αποτελεί τέλειο υπόστρωμα για την παρουσία AFs. Τα υπόλοιπα δείγματα, αποτελούνταν από αυτούσια ή μίγμα σιτηρεσίων όπως το σιτάρι, το κριθάρι, η βρώμη και η σόγια, τα οποία είναι λιγότερο ευπαθή στη μόλυνση από AFs και μυκοτοξίνες γενικότερα.

2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ELISA

Συνολικά, 45 δείγματα ζωοτροφών αναλύθηκαν με ELISA (R-Biopharm, Ridascreen® Aflatoxin Total (R4701), Darmstadt, Germany). Τα δείγματα προετοιμάστηκαν και αναλύθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Παράρτημα 4)

Το κιτ παρείχε μια πλάκα 96 κελίων, διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) για τον καθαρισμό των φρεατίων (μικροπηγαδιών), τα σχετικά διαλύματα Conjugate, Chromogen, Antibodies, Substrate και Stop solution για την επίτευξη της ενζυμικής αντίδρασης.

Ενδεικτικά, ζυγίστηκαν 2gr από κάθε δείγμα ζωοτροφής, στο οποίο προστέθηκαν 10ml διαλύματος μεθανόλης : νερού (70:30), ανακινήθηκαν για 10 λεπτά και διηθήθηκαν. Έπειτα, 50μl από κάθε διάλυμα προτύπου προστέθηκε στην πλάκα μικροτιλοδότισης με την βοήθεια αυτόματης πιπέτας και σε κάθε επόμενο δύο μικροπηγάδια, 50μl από το διήθημα του κάθε δείγματος. Έστερα, προστέθηκαν σε όλα τα μικροπηγάδια 50μl από το διάλυμα σύζευξης (enzyme conjugate) με την χρήση οκτακάναλης πιπέτας, ακολούθησε η προσθήκη 50μl από το διάλυμα ab (antibody solution) και επώαση σε σκοτεινό μέρος και θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, ακολούθησε πλύσιμο των μικροπηγαδιών με τη βοήθεια του υγρού πλυσίματος (washing buffer) 3 φορές και η προσθήκη 100μl από το διάλυμα χρωμογόνου (substrate/ Chromogen) σε κάθε μικροπηγάδι, επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτάδι. Τέλος, μετά το πέρας των 15 λεπτών προστέθηκαν σε κάθε μικροπηγάδι 100μl διαλύματος (stop solution) για να σταματήσει η αντίδραση και ακολούθησε φωτομέτρηση της πλάκας των φρεατίων στα 450nm. Η συσκευή ανάγνωσης ELISA παρουσιάζεται στην εικόνα 5.



Εικόνα 5: Συσκευή ανάγνωσης ELISA

Τα επίπεδα του συνόλου των AFs στα δείγματα των ζωοτροφών, υπολογίστηκαν με την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, με την χρησιμοποίηση των περιεχομένων προτύπων διαλυμάτων του κιτ, σε συγκεντρώσεις από 0 έως 4,05 ppb(μg/kg). Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του Τ.Ε.Ι Πελοποννήσου το διάστημα Νοεμβρίου 2013- Ιουνίου 2014. Το πρωτόκολλο ανάλυσης παρουσιάζεται αναλυτικά στο παράρτημα 5.

2.3 ΥΛΙΚΑ

- ✓ Διηθητικό χαρτί whatman
- ✓ Οκτακάναλη πιπέτα των 20-200μl με τα αντίστοιχα ρύγγη
- ✓ Πιπέτες των 100-1000μl με τα αντίστοιχα ρύγγη
- ✓ Πλαστικά σωληνάρια φυγόκεντρου των 100ml
- ✓ Σιφόνια των 10ml
- ✓ Γυάλινα φιαλίδια
- ✓ Βασικός εργαστηριακός εξοπλισμός (γάντια μιας χρήσεως, απορροφητικό χαρτί, κουταλάκια, ογκομετρική φιάλη 1lt, γυάλινα χωνιά, φιαλίδια με καπάκι των 10ml).

2.4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- ✓ Υπερκάθαρο νερό (3D)
- ✓ Μεθανόλη
- ✓ Διάλυμα μεθανόλης – νερού (70% μεθανόλης)
- ✓ PBS ρυθμιστικό διάλυμα σε PH 7,4
- ✓ Πρότυπα μίγματα αφλατοξινών σε μεθανόλη 0, 0,05, 0,15, 1,35 και 4,05ppb.
- ✓ Conjugate
- ✓ Stop solution
- ✓ Anti- Aflatoxin antibodies
- ✓ Substrate/Chromogen

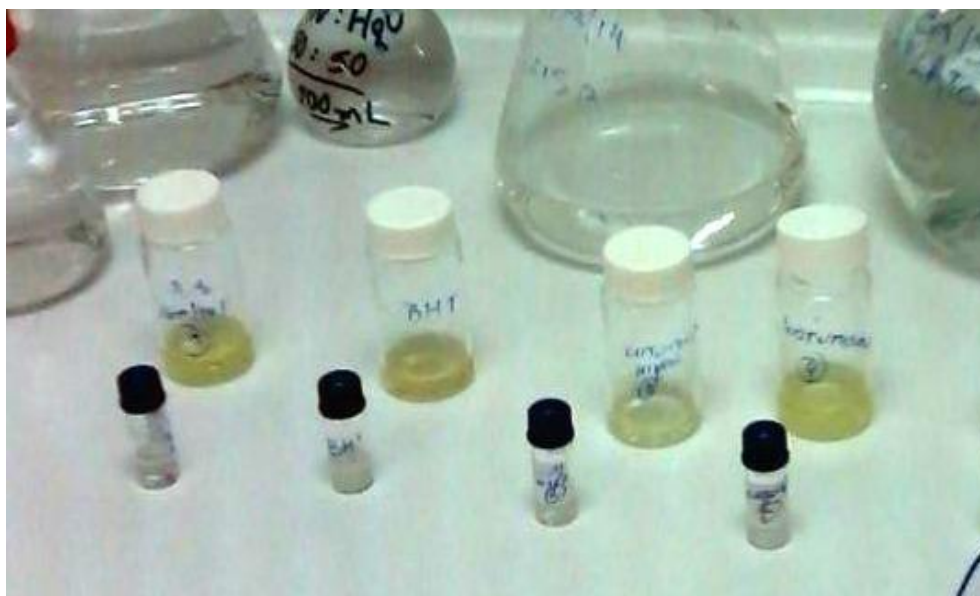
2.5 ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

- ✓ Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια 0,01
- ✓ Μύλος άλεσης
- ✓ Vortex mixer
- ✓ Πλάκα κυψελίδων μικροτιτλοδότησης.
- ✓ Συσκευή ανάγνωσης ELISA (Bio-Tech ELX808 Absorbance microplate reader)

2.6 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

2.6.1 ΑΛΕΣΗ- ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Η διαδικασία ανάλυσης των δειγμάτων για AFs, ξεκινά με την άλεση των δειγμάτων σε λεπτά σωματίδια, με ειδικό εργαστηριακό μύλο και επιμελή ανάμειξη, ώστε να επιτευχθεί πλήρης ομογενοποίηση. Σε αναλυτικό ζυγό ζυγίστηκαν 2gr από κάθε αλεσμένη ζωοτροφή, τα οποία μεταφέρθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκεντρίσεως. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 10ml διαλύματος μεθανόλης : νερού (70:30) και ανακινήθηκε έντονα με τη βοήθεια vortex για 10 λεπτά ώστε να επιτευχθεί η εκχύλιση των AFs. Τέλος, μετά την έντονη ανάδευση, ακολούθησε διήθηση των μιγμάτων. Από το διήθημα, συλλέχθηκαν 100μl και αραιώθηκαν με 600μl υπερκάθαρο νερό και φυλάχθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια για περαιτέρω επεξεργασία με την μέθοδο ELISA (Εικόνα 6).

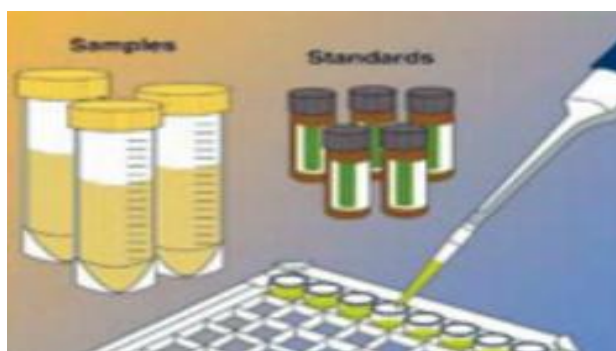


Εικόνα 6: Αραίωση και φύλαξη δειγμάτων

2.6.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ELISA

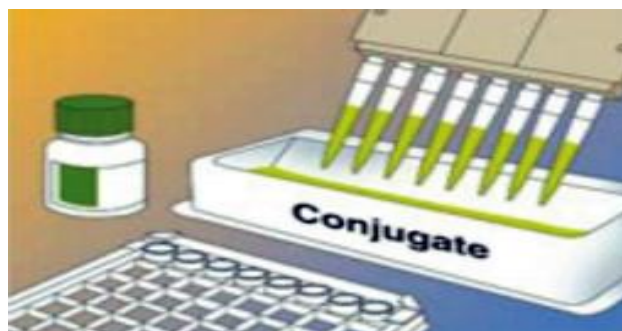
Στην πλάκα ELISA, τοποθετήθηκαν τόσες οκτάδες μικροπηγαδιών, όσες χρειάστηκαν κάθε φορά, ανάλογα με τον αριθμό των προς ανάλυση δειγμάτων και οι υπόλοιπες τοποθετήθηκαν πάλι στην αλουμινένια συσκευασία, κλείστηκαν καλά και φυλάχθηκαν επιμελώς στο ψυγείο.

Αρχικά, στα πρώτα 5 μικροπηγάδια / φρεάτια της πλάκας μικροτιτλοδότησης, προστίθεται 50μl από τα έτοιμα διαλύματα προτύπων του κατασκευαστή, για την περεταίρω κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης. Στα επόμενα δυο μικροπηγάδια, όπως φαίνεται στην εικόνα 7, προστίθενται 50μl από το διηθημένο προηγουμένως δείγμα ζωοτροφής, και αυτό για να ληφθεί ο μέσος όρος των δυο απορροφήσεων και να εξαλειφτεί το τυχόν σφάλμα.



Εικόνα 7. Πλήρωση μικροπηγαδιών με διάλυμα πρότυπων και δειγμάτων

Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε όλα τα χρησιμοποιούμενα μικροπηγάδια (εκείνα που περιείχαν διάλυμα προτύπου και εκείνα με το δείγμα), 50μl από το διάλυμα ‘enzyme conjugate’ όπως φαίνεται στην εικόνα 8, 50μl από το διάλυμα ‘antibody solution’, αναδεύθηκαν ελαφρά και ακολούθησε επώαση σε σκοτεινό περιβάλλον με θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.



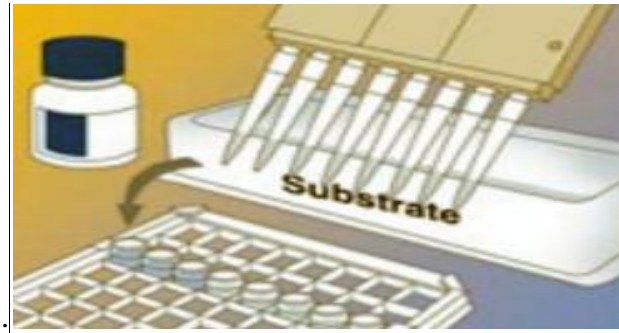
Εικόνα 8. Προσθήκη διαλύματος “enzyme conjugate”

Μετά το πέρας των 30 λεπτών, το περιεχόμενο απομακρύνθηκε σε απορροφητικό χαρτί και ταμponαρίστηκε ελαφρά για την απομάκρυνση του περιεχομένου των μικροπηγαδιών όπως φαίνεται στην εικόνα 9. Ύστερα, στα χρησιμοποιούμενα μικροπηγάδια προστέθηκαν 250μl από το ειδικό υγρό έκπλυσης (washing buffer), ανακινήθηκε ελαφρά και το περιεχόμενο απομακρύνθηκε ταμponαριστά σε απορροφητικό χαρτί. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε δυο φορές. Στόχος της, ήταν να απομακρυνθεί πλήρως το ελεύθερο αντιγόνο.



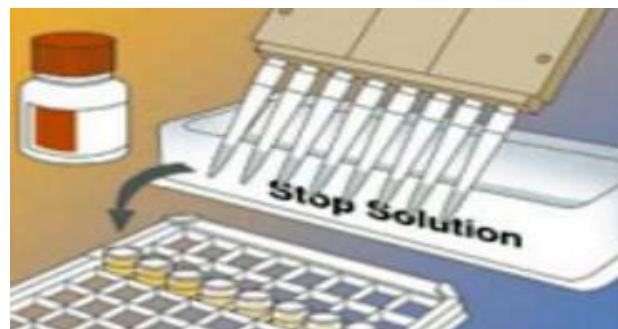
Εικόνα 9. Απομάκρυνση περιεχομένου σε απορροφητικό χαρτί

Έπειτα, σε όλα τα χρησιμοποιούμενα μικροπηγάδια προστέθηκαν 100μl από το διάλυμα ‘substrate/Chromogen’, αναδεύτηκαν ελαφρά και επωάστηκαν σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά όπως φαίνεται παρακάτω στην εικόνα 10.

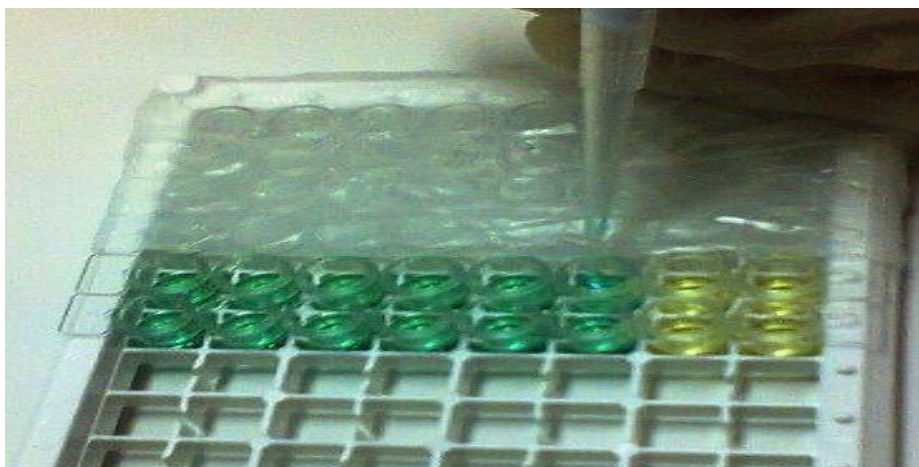


Εικόνα 10. Προσθήκη διαλύματος “substrade / Chromogen

Στη συνέχεια, η αντίδραση τερματίζονται με την προσθήκη διαλύματος 100ml ανά κελί (stop solution), όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 11 και το περιεχόμενο των κελιών άλλαξε το χρώμα τους σε κίτρινο όπως φαίνεται στην εικόνα 12 ^[76]. και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 450nm με τη χρήση της συσκευής ανάγνωσης ELISA. Μετά τη φωτομέτρηση, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των δυο απορροφήσεων για κάθε δείγμα ζωοτροφής και αφαιρέθηκε η απορρόφηση του τυφλού από το καθένα.



Εικόνα 11. Προσθήκη διαλύματος τερματισμού



Εικόνα 12: Αλλαγή χρώματος - τερματισμός της αντίδρασης

Τέλος, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη τοποθετώντας στον άξονα X τον λογάριθμο των συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων επί τις εκατό (LOG C (%)) και στον άξονα Y το λογάριθμο της απορρόφησης των προτύπων επί της εκατό (LOG ABS (%)). Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε AFs, πραγματοποιήθηκε παρεμβάλλοντας τις τιμές της απορρόφησης των δειγμάτων, μετά την αφαίρεση του τυφλού στην καμπύλη αναφοράς.

2.7 ΚΑΜΠΥΛΗ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ

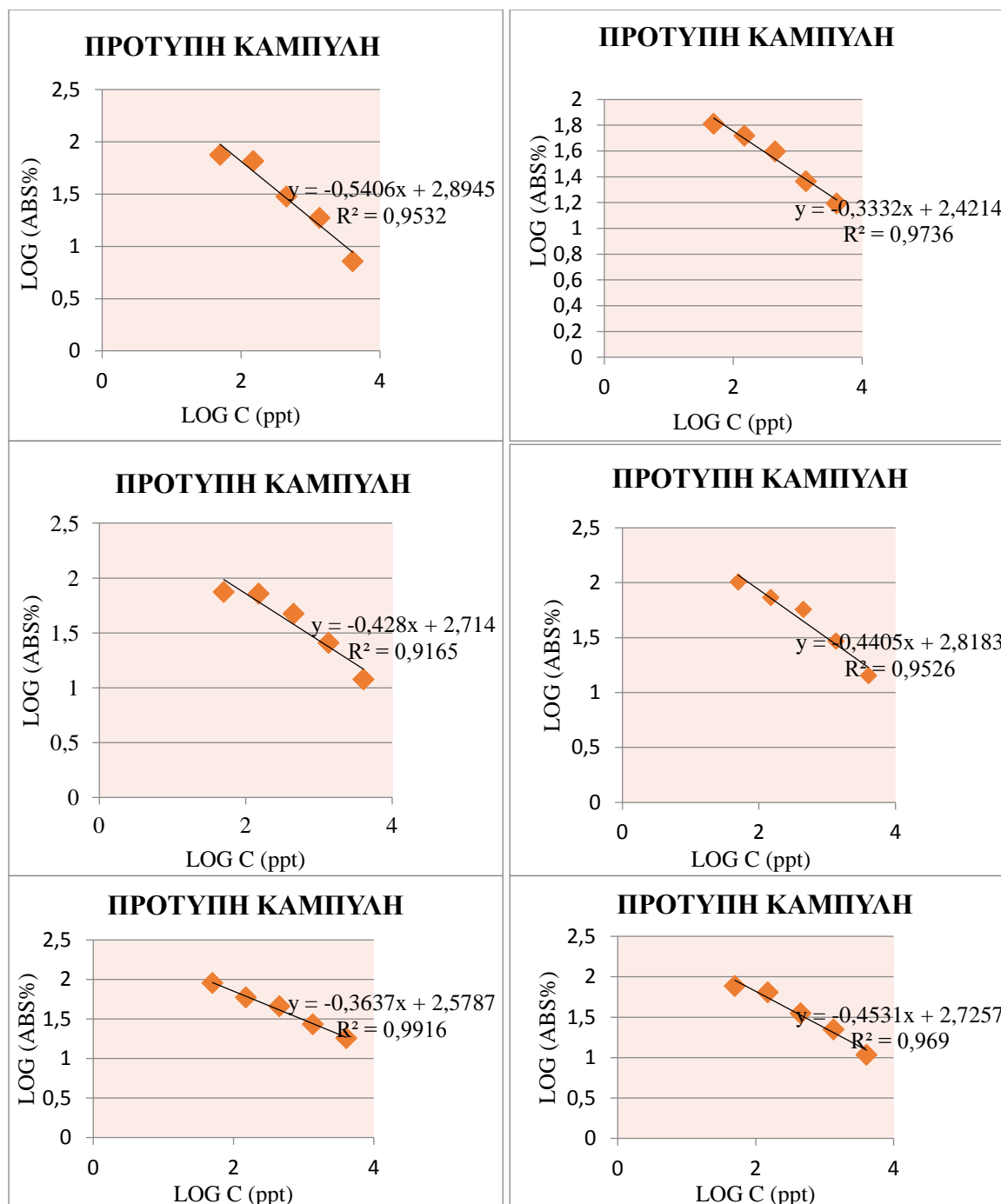
Από τις απορροφήσεις των προτύπων που λήφθηκαν, μέσω της συσκευής ανάγνωσης ELISA, σχεδιάστηκε η πρότυπη καμπύλη των AFs, έτσι ώστε να επιτευχθεί η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με πιθανή περιεχόμενη AFs.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα διαλύματα μίγματος AFs που υπήρχαν στο κιτ, σε καθορισμένες συγκεντρώσεις που εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3). Ο διαλύτης των προπαρασκευασμένων προτύπων διαλυμάτων, ήταν μίγμα μεθανόλης – νερού 70:30 όμοιος με τον διαλύτη εκχύλισης των AFs που χρησιμοποιήθηκε για τα δείγματα.

Πίνακας 3 Συγκεντρώσεις προτύπων αφλατοξίνης

Αριθμός προτύπων	Συγκέντρωση προτύπων (μg/kg)
1	0
2	0,05
3	0,15
4	0,45
5	1,35
6	4,05

Κατά την ανάλυση δειγμάτων με ELISA, δημιουργήθηκαν πρότυπες καμπύλες 6 επιπέδων οι οποίες παρουσιάζονται παρακάτω στο γράφημα 1 και η γραμμική συσχέτιση R^2 κυμαίνονταν από 0,91 έως 0,97.



Γράφημα 1: Πρότυπες καμπύλες ανάλυσης ELISA

Ενδεικτικά, παρουσιάζεται μια πρότυπη καμπύλη στο γράφημα 2. Με βάση τις εξισώσεις των γραφημάτων προέκυψε η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων ζωοτροφών σε AFs.

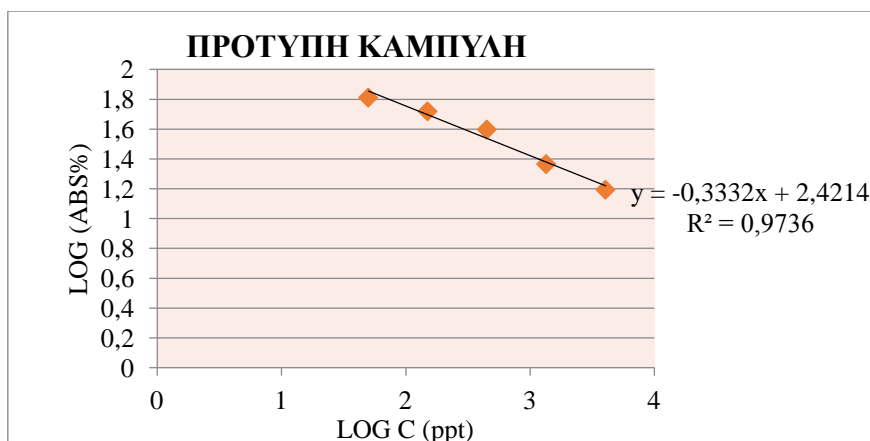
Για την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών έγιναν οι εξής υπολογισμοί όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 4:

- Όπου C (ppb), οι συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων σε ppb (1^η στήλη πίνακα).
- Στην 2^η στήλη εμφανίζονται οι απορροφήσεις των προτύπων οι οποίες έδειξε ο καταγραφέας του οργάνου ELISA.
- Στην 3^η στήλη, υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων σε ppt, με τη βοήθεια του τύπου: (ppb*1000)
- Στην 4^η στήλη υπολογίζεται η επί τοις εκατό απορρόφηση των προτύπων, θέτοντας την απορρόφηση του προτύπου μηδέν ως την 100% απορρόφηση, και υπολογίζοντας βάση αυτού και τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις με βάση των τύπο: $\frac{\text{απορρόφηση (προτύπου)}}{\text{απορρόφηση μηδενικού προτύπου}} * 100$. Έτσι προκύπτει η 4^η στήλη του πίνακα.
- Ύστερα, υπολογίζεται ο λογάριθμος των συγκεντρώσεων σε ppt (5^η στήλη) (LOG C (ppt)) ως εξής: LOG (C (ppt)).
- Τέλος, υπολογίζεται ο λογάριθμος της απορρόφησης επί της εκατό (LOG ABS %), ακολούθως: LOG (ABS%).

Πίνακας 4: Υπολογισμοί κατασκευής πρότυπης καμπύλης

<u>C (ppb)</u>	<u>ABS</u>	<u>C (ppt)</u>	<u>ABS(%)</u>	<u>LOG C (ppt)</u>	<u>LOG (ABS%)</u>
0	2,148	0	100	0	0
0,05	1,646	50	76,62942	1,69897	1,884396
0,15	1,376	150	64,05959	2,176091	1,806584
0,45	0,756	450	35,19553	2,653213	1,546488
1,35	0,477	1350	22,2067	3,130334	1,346484
4,05	0,232	4050	10,80074	3,607455	1,033454

Με βάση τις καθοδηγήσεις του κατασκευαστή, για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήθηκαν οι λογάριθμοι των συγκεντρώσεων σε ppt (LOG C (ppt)) στον άξονα X και οι λογάριθμοι των απορροφήσεων επί της εκατό (LOG (ABS%)) στον άξονα Y, όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω πρότυπη καμπύλη (Γράφημα 2).



Γράφημα 2: Πρότυπη καμπύλη ανάλυσης ELISA

Η εξίσωση που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη, είναι της μορφής $Y=aX+\beta$. Έτσι θέτοντας ως X το μέσο όρο των δυο απορροφήσεων ενός δείγματος και λύνοντας την εξίσωση βρίσκουμε το λογάριθμο της συγκέντρωσής του σε ppt. Η μετατροπή του λογαρίθμου των συγκεντρώσεων από ppt σε ppb για να γίνει η ερμηνεία των αποτελεσμάτων περιγράφεται σε επόμενο κεφάλαιο που αφορά την ποσοτικοποίηση.

2.8 ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Ως LOD (Limit of Detection), ή κατώτερο όριο ανίχνευσης, ορίζεται η μικρότερη συγκέντρωση (ή ποσότητα μιας ουσίας) που μπορεί να ανιχνευθεί, ενώ το LOQ (Limit of Quantification), ή κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης, είναι η μικρότερη συγκέντρωση (ή ποσότητα ουσίας) που μπορεί να αναφερθεί ποσοτικά με ικανοποιητικό βαθμό εμπιστοσύνης. Επομένως, κρίνεται σκόπιμο η εύρεση αυτών των κατώτερων ορίων, έτσι ώστε να μπορέσουμε να ερμηνεύσουμε τα αποτελέσματα της κάθε μεθόδου και να δώσουμε αξιόπιστα αποτελέσματα ^[80].

Η τιμή του LOD δίνεται από τον κατασκευαστή και ανέρχεται στα 1,75 ppb (Παράρτημα 5). Έστω X το αποτέλεσμα της ανάλυσης ενός δείγματος. Τότε για να υποστηρίξουμε αν αυτό είναι πραγματικά ανιχνεύσιμο θα πρέπει:

✓ Αν $LOQ < X$ αποφαινόμεστε ότι η ουσία A βρίσκεται στο δείγμα στη συγκέντρωση που υπολογίσαμε μέσω της καμπύλης αναφοράς.

✓ Αν $LOD < X < LOQ$ αποφαινόμαστε ότι ανιχνεύτηκε η ουσία A στο δείγμα με τη δεδομένη μέθοδο χωρίς να δώσουμε αριθμητικό αποτέλεσμα και αναφέρουμε ότι $X < LOQ$ (δίνοντας την τιμή του LOQ).

✓ Αν $X < LOD$ δεν ανιχνεύτηκε η ουσία A δείγμα με τη δεδομένη μέθοδο και αναφέρουμε το LOD της μεθόδου [80].

Όπως φαίνεται, τα αποτελέσματα των δειγμάτων, βρέθηκαν τιμές χαμηλότερες του ορίου ανίχνευσης, άρα τα δείγματα ήταν καθαρά.

2.9 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ELISA

Οι υπολογισμοί που πραγματοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με βάση τις απορροφήσεις που λήφθηκαν, περιγράφονται παρακάτω και παρουσιάζονται ενδεικτικά τον πίνακα 5.

- Αρχικά, με βάση την πρότυπη καμπύλη που σχεδιάστηκε κάθε φορά, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση $Y=aX+\beta$.
- Στη συνέχεια, από τις δύο απορροφήσεις κάθε δείγματος που λήφθηκαν βρέθηκε ο μέσος όρος τους.
- Στο επόμενο βήμα, υπολογίστηκε η επί τοις εκατό απορρόφηση των δειγμάτων, με βάση την απορρόφηση του μηδενικού προτύπου που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης σύμφωνα με τον τύπο: (Μ.Ο απορρόφησης δείγματος / απορρόφηση μηδενικού προτύπου) * 100
- Ύστερα, όπως περιγράφηκε παραπάνω, υπολογίστηκε ο λογάριθμος της επί της εκατό απορρόφησης.
- Τέθηκε όπου X στην εξίσωση το αποτέλεσμα που πήραμε από την κάθε τιμή του λογαρίθμου της επί τοις εκατό απορρόφησης (LOG (ABS%)) και οι τιμές από την επίλυση της εξίσωσης παρουσιάζονται στη στήλη 7
- Τέλος, η κάθε τιμή που πήραμε από την επίλυση της εξίσωσης, χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστεί η συγκέντρωση σε ppt ως εξής:
 $10^{\text{αποτέλεσμα εξίσωσης}}$

Παράδειγμα: $10^{1,703283} = 50,49886$ ppt

Και για την μετατροπή της συγκέντρωσης από ppt σε ppb, διαιρούμε τα ppt δια του χίλια, όπως φαίνεται στην τελευταία στήλη του πίνακα.

Πίνακας 5: Παράδειγμα ποσοτικοποίησης ELISA

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ	ABS1	ABS2	M.O ABS	ABS(%)	LOG ABS(%)	ΑΠΟΤΕΛ ΕΣΜΑΤΑ	PPT	PPB
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ ΟΛΟΚΛΗΡΟ (ΠΡΕΒΕΖΑ)	1,67	1,829	17495	96,60409	1,984995	1,703282	50,49886	0,050499
ΤΡΟΦΗ ΓΙΑ ΚΟΥΝΕΛΙΑ (ΠΡΕΒΕΖΑ)	1,65	1,482	1,566	86,47156	1,936873	1,815717	65,42091	0,065421
ΤΡΟΦΗ ΓΙΑ ΚΟΥΝΕΛΙΑ (ΘΕΣΠΡΩΤΙΑ)	1,653	1,369	1,511	83,43457	1,921346	1,851995	71,12058	0,071121
ΤΡΟΦΗ ΓΙΑ ΜΕΓΑΛΑ ΚΟΤΟΠΟΥΛΑ (ΠΡΕΒΕΖΑ)	1,388	1,486	1,437	79,34843	1,899538	1,902948	79,97382	0,079974
ΑΛΕΥΡΩΔΗΣ ΤΡΟΦΗ ΓΙΑ ΜΙΚΡΑ ΚΟΤΟΠΟΥΛΑΚΙΑ ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ (ΘΕΣΠΡΩΤΙΑ)	1,673	1,46	1,5665	86,49917	1,937012	1,815393	65,37213	0,065372

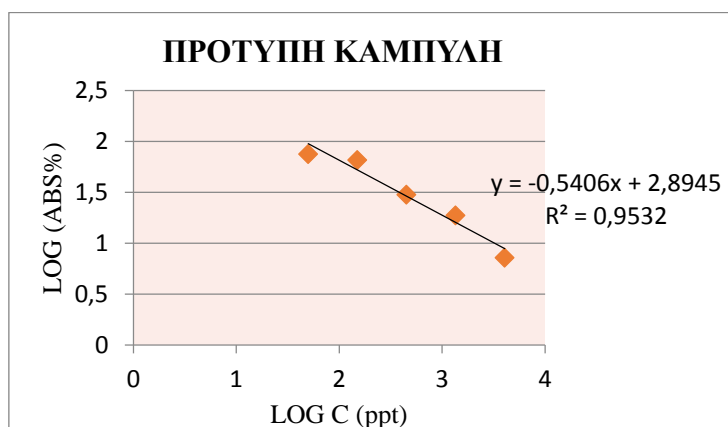
2.10 ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Για τη δοκιμή ανάκτησης, λήφθηκε δείγμα ζωοτροφής, το οποίο δεν περιείχε AFs ύστερα από έλεγχο που πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης. Το δείγμα ζωοτροφής, μολύνθηκε με 0,2, 0,5 και 1ppb συνολικής AFs από πρότυπο που παρασκευάστηκε από το αρχικό (εταιρικό) πρότυπο των 2000ppb, με διαδοχικές αραιώσεις σε μεθανόλη. Για όλες τις συγκεντρώσεις πραγματοποιήθηκαν δυο επαναλήψεις.

Η διαδικασία για τη δοκιμή ανάκτησης ήταν η ακόλουθη: Αρχικά, λήφθηκε ποσότητα καθαρού δείγματος 2 γραμμαρίων και εν συνεχεία μολύνθηκαν με την αντίστοιχη γνωστή συγκέντρωση των προτύπων που είχαν προπαρασκευαστεί. Το δείγμα αναδεύθηκε σχολαστικά, έτσι ώστε η τοξίνη να καταλαμβάνει όλη τη μάζα του δείγματος και να κατανεμηθεί ομοιόμορφα. Στη συνέχεια, η προετοιμασία των τεχνητά μολυσμένων δειγμάτων, ήταν παρόμοια με αυτή που ακολουθείται για τα άγνωστα δείγματα ζωοτροφών.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της περιεχόμενης AFs των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία και υπολογισμοί ποσοτικοποίησης που έγιναν και για τα άγνωστα δείγματα ζωοτροφών. Η πρότυπη καμπύλη που σχεδιάστηκε για την ποσοτικοποίηση των τεχνητά επιμολυσμένων δειγμάτων, φαίνεται στο γράφημα 3. Στη συνέχεια για να βρεθεί το ποσοστό ανάκτησης χρησιμοποιήθηκε η εξής σχέση:

$$\text{Ανάκτηση (\%)} = (\text{Ποσότητα AFs που ανιχνεύθηκε} / \text{Ποσότητα AFs που πρόσθεσα}) * 100$$



Γράφημα 3: Πρότυπη καμπύλη δοκιμών ανάκτησης

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την δοκιμή ανάκτησης, παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα 6.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα δοκιμών ανάκτησης

Συγκέντρωση επιμόλυνσης (ppb)	Μέσος όρος απορροφήσεων	Προσδιορισθείσα συγκέντρωση (ppb)	Ανάκτηση (%)
0.1	1.1995	0	0
0.2	0.9965	0	0
1	0.6835	0	0

Η επιλογή των τιμών αυτών, έγινε για να επιτευχθεί η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων και η επικύρωση της μεθόδου, καθώς αν το τεχνητά επιμολυσμένο δείγμα εμφάνιζε ποσότητα AFs μεγαλύτερης του ορίου ανίχνευσης τότε τα αποτελέσματα των δειγμάτων θα ήταν εσφαλμένα. Ωστόσο, οι τιμές που πήραμε ήταν λογικά ορθές.

Παρατηρώντας τις τιμές του παραπάνω πίνακα, διαπιστώνεται ότι οι τιμές είναι αναμενόμενες για τη συγκεκριμένη μέθοδο, εφόσον η μεγαλύτερη συγκέντρωση ήταν 1ppb και το όριο ανίχνευσης 1,75ppb και τα αποτελέσματα δεν ξεπέρασαν το όριο αυτό. Επομένως, τα αποτελέσματα των δοκιμών ανάκτησης έρχονται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία και τον κατασκευαστή, πως η ανάλυση ELISA δεν ενδείκνυται για αναλύσεις σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά για ένα γρήγορο συμπέρασμα, για το αν ένα δείγμα έχει ή όχι AFs, πάνω από τα ανώτατα επιτρεπτά όρια που έχει θεσπίσει η Ευρωπαϊκή Νομοθεσία.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ

Σύμφωνα με τις αναλύσεις των δειγμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε 45 δείγματα ζωοτροφών, κανένα από αυτά δεν εμφάνισε AFs. Αναλυτικά, τα αποτελέσματα των δειγμάτων παρουσιάζονται στο πίνακα 7. Αντίστοιχα στον πίνακα 8, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα όλων των δειγμάτων και ο χαρακτηρισμός αυτών θετικά / αρνητικά, ως προς τα όρια που έχει θεσπίσει η Ε.Ε σχετικά με την εμφάνιση AFs στις ζωοτροφές.

Πίνακας 7: Ποσοτικοποίηση με ELISA

Δείγμα	M.O ABS	Συγκέντρωση αφλατοξίνης (ppb)
ΣΠΗΡΕΣΙΑ Σ1	1,0775	0,01863
ΣΠΗΡΕΣΙΑ Σ2	1,062	0,01945
ΣΠΗΡΕΣΙΑ Σ3	0,894	0,03262
ΣΠΗΡΕΣΙΑ Σ4	0,846	0,0385
ΣΠΗΡΕΣΙΑ Σ5	0,9265	0,0293
ΠΤΕΡΑΛΕΥΡΟ Π	0,884	0,03374
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ (2013) Κ1	1,0395	0,02075
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ (2013) Κ2	0,8365	0,03982
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ ΑΛΛΟΙΩΜΕΝΟ (2012) Κ3	0,767	0,05166
ΚΡΙΘΑΡΙ (2013) Κ4	0,939	0,02815
ΚΡΙΘΑΡΙ (2013) Κ5	1,039	0,02078
ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ Κ6	0,8935	0,03267
ΣΙΤΑΡΙ (2012) Κ7	0,927	0,02926
ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΙΓΟΠΡΟΒΑΤΩΝ 16	0,731	0,015425

ΧΩΡΙΚΗΣ ΠΙΘΝΟΤΡΟΦΙΑΣ 13B	0,593	0,027559
ΠΑΧΥΝΣΗΣ ΜΟΣΧΑΡΙΩΝ 15	1,57	0,087822
ΠΑΧΥΝΣΕΩΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΟΥΝΕΛΙΩΝ 22	0,8145	0,010631
ΠΑΧΥΝΣΗΣ ΧΟΙΡΩΝ 20	1,431	0,108393
ΠΑΧΥΝΣΗΣ ΑΜΝΟΕΡΙΦΙΩΝ 17	1,356	0,122483
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ & ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΟΥΝΕΛΙΩΝ 22 * *	0,699	0,016823
ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΟΥΛΕΡΙΚΩΝ 18	1,273	0,141367
ΜΙΓΜΑ ΧΟΙΡΙΔΙΩΝ 23	0,7645	0,012858
ΟΙΚΟΣΙΤΩΝ ΖΩΩΝ 13	1,388	0,116166
ΠΑΧΥΝΣΕΩΣ ΑΜΝΟΕΡΙΦΙΩΝ 31	1,356	0,008052
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ (Α.Σ)	1,769	0,061334
ΜΙΓΜΑ	1,9205	0,051161
ΚΟΥΝΕΛΟΤΡΟΦΗ (ΠΙΡΕΒΕΖΑ)	1,566	0,065421
ΜΙΓΜΑ	1,437	0,079974
ΠΥΤΙΡΑ ΣΙΤΟΥ ΨΙΛΑ	1,7065	0,066401
ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ ΓΙΑ ΧΟΙΡΟΥΣ	1,7875	0,059941
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ (ΠΙΡΕΒΕΖΑ)	1,7495	0,050499
ΚΟΥΝΕΛΟΤΡΟΦΗ (ΘΕΣΠΡΩΤΙΑ)	1,511	0,071121
ΜΙΓΜΑ	1,46	0,065372
ΦΥΡΑΜΑ	1,721	0,080673
ΣΙΤΑΡΙ	1,331	0,079723
ΣΟΓΙΑ	1,7185	0,068762
ΜΙΓΜΑ	1,5865	0,085661

ΚΟΥΝΕΛΟΤΡΟΦΗ	1,74	0,066451
ΒΡΩΜΗ	1,851	0,091529
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ ΟΛΟΚΛΗΡΟ	1,651	0,115603
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ ΨΙΛΟΚΟΜΕΝΟ	1,6455	0,116393
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ ΧΟΝΤΟΚΟΜΕΝΟ	1,813	0,09549
ΚΡΙΘΑΡΙ	1,735	0,104461
ΣΙΤΑΡΙ ΜΑΛΑΚΟ	1,8155	0,095221

Πίνακας 8: Αποτελέσματα δειγμάτων

Δείγμα Νο	Είδος	Περιεκτικότητα σε ρρβ	Χαρακτηρισμός
1	ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ	<LOD	Αρνητικό
2	ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ	<LOD	Αρνητικό
3	ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ	<LOD	Αρνητικό
4	ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ	<LOD	Αρνητικό
5	ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ	<LOD	Αρνητικό
6	ΠΤΕΡΑΛΕΥΡΟ	<LOD	Αρνητικό
7	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ (2013)	<LOD	Αρνητικό
8	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ (2013)	<LOD	Αρνητικό
9	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ ΑΛΛΟΙΩΜΕΝΟ (2012)	<LOD	Αρνητικό
10	ΚΡΙΘΑΡΙ (2013)	<LOD	Αρνητικό
11	ΚΡΙΘΑΡΙ (2013)	<LOD	Αρνητικό
12	ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	<LOD	Αρνητικό
13	ΣΙΤΑΡΙ (2012)	<LOD	Αρνητικό
14	ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΙΓΟΠΡΟΒΑΤΩΝ	<LOD	Αρνητικό
15	ΧΩΡΙΚΗΣ ΠΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑΣ	<LOD	Αρνητικό
16	ΠΑΧΥΝΣΗΣ ΜΟΣΧΑΡΙΩΝ	<LOD	Αρνητικό
17	ΠΑΧΥΝΣΕΩΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	<LOD	Αρνητικό

	ΚΟΥΝΕΛΙΩΝ		
18	ΠΑΧΥΝΣΗΣ ΧΟΙΡΩΝ	<LOD	Αρνητικό
19	ΠΑΧΥΝΣΗΣ ΑΜΝΟΕΡΙΦΙΩΝ	<LOD	Αρνητικό
20	ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ & ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΟΥΝΕΛΙΩΝ	<LOD	Αρνητικό
21	ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΟΥΛΕΡΙΚΩΝ	<LOD	Αρνητικό
22	ΜΙΓΜΑ ΧΟΙΡΙΔΙΩΝ	<LOD	Αρνητικό
23	ΟΙΚΟΣΙΤΩΝ ΖΩΩΝ	<LOD	Αρνητικό
24	ΠΑΧΥΝΣΕΩΣ ΑΜΝΟΕΡΙΦΙΩΝ	<LOD	Αρνητικό
25	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ (Α.Σ)	<LOD	Αρνητικό
26	ΜΙΓΜΑ	<LOD	Αρνητικό
27	ΚΟΥΝΕΛΟΤΡΟΦΗ (ΠΙΡΕΒΕΖΑ)	<LOD	Αρνητικό
28	ΜΙΓΜΑ	<LOD	Αρνητικό
29	ΠΥΤΙΡΑ ΣΙΤΟΥ ΨΙΛΑ	<LOD	Αρνητικό
30	ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ ΓΙΑ ΧΟΙΡΟΥΣ	<LOD	Αρνητικό
31	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ (ΠΙΡΕΒΕΖΑ)	<LOD	Αρνητικό
32	ΚΟΥΝΕΛΟΤΡΟΦΗ (ΘΕΣΠΡΩΤΙΑ)	<LOD	Αρνητικό
33	ΚΟΥΝΕΛΟΤΡΟΦΗ (ΠΙΡΕΒΕΖΑ)	<LOD	Αρνητικό
34	ΜΙΓΜΑ	<LOD	Αρνητικό
35	ΦΥΡΑΜΑ	<LOD	Αρνητικό
36	ΣΙΤΑΡΙ	<LOD	Αρνητικό
37	ΣΟΓΙΑ	<LOD	Αρνητικό
38	ΜΙΓΜΑ	<LOD	Αρνητικό
39	ΚΟΥΝΕΛΟΤΡΟΦΗ	<LOD	Αρνητικό
40	ΒΡΩΜΗ	<LOD	Αρνητικό
41	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ ΟΛΟΚΛΗΡΟ	<LOD	Αρνητικό
42	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	<LOD	Αρνητικό
43	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	<LOD	Αρνητικό
44	ΚΡΙΘΑΡΙ	<LOD	Αρνητικό

45	ΣΙΤΑΡΙ ΜΑΛΑΚΟ	<LOD	Αρνητικό
----	---------------	------	----------

Σύμφωνα με τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα, φαίνεται ολοκάθαρα ότι όλα τα χρησιμοποιούμενα δείγματα πληρούσαν τις προδιαγραφές που έχει θεσπίσει η Ε.Ε, καθώς οι συγκεντρώσεις των AFs δεν υπέρβαιναν το ανώτατο επιτρεπτό όριο. Ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων όλων των δειγμάτων κυμαίνονταν στα 0,059698ppb, ενώ η τυπική απόκλιση ήταν 0,03558ppb. Αντίστοιχα, για τη βόρεια Ελλάδα ο μέσος όρος των δειγμάτων ήταν 0,03041ppb, για τη νότια ήταν 0,075798ppb και για τη δυτική Ελλάδα 0,062352ppb. Αναλυτικά τα αποτελέσματα από την ανάλυση των δειγμάτων και οι απορροφήσεις που καταγράφηκαν από τη συσκευή ανάγνωσης ELISA για όλα τα δείγματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 9.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα ανάλυσης ELISA

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ABS1	ABS2	M.O ABS
ΦΙΡΑΜΑ	1.22	1.721	1.6215
ΣΙΤΑΡΙ	1.26	1.331	1.6285
ΣΟΓΙΑ	1.728	1.709	1.7185
ΜΙΓΜΑ	1.677	1.496	1.5865
ΚΟΥΝΕΛΟΤΡΟΦΗ	1.523	1.957	1.74
ΒΡΩΜΗ	1.863	1.839	1.851
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ			
ΟΛΟΚΛΗΡΟ	1.579	1.723	1.651
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ			
ΨΙΛΟΚΟΜΜΕΝΟ	1.635	1.656	1.6455
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ			
ΧΟΝΤΡΟΚΟΜΜΕΝΟ	1.836	1.79	1.813
ΚΡΙΘΑΡΙ	1.84	1.63	1.735
ΣΙΤΑΡΙ ΜΑΛΑΚΟ	1.876	1.755	1.8155
N18	1.22	1.326	1.273
N15	1.544	1.596	1.57
N17	1.378	1.334	1.356
N13	1.389	1.387	1,388
N20	1.493	1.369	1.431
N16	0.708	0.731	0.7195
ΧΩΡΙΚΗΣ			
ΠΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑΣ	0.584	0.602	0.593
N22	0.874	0.755	0.8145

K25 SUPER	0.611	0.787	0.699
ΜΙΓΜΑ ΧΟΙΡΙΑΔΙΩΝ	0.82	0.709	0.7645
ΠΑΧΥΝΣΕΩΣ			
ΑΜΝΟΕΡΙΦΙΩΝ	0.887	0.9	0.8935
Σ1	1.116	1.039	1.0775
Σ2	1.168	0.956	1.062
Σ3	0.837	0.951	0.894
Σ4	0.727	0.965	0.846
Σ5	0.892	0.961	0.9265
Π	0.765	1.003	0.884
K1	1.006	1.073	1.0395
K2	0.931	0.742	0.8365
K3	0.83	0.751	0.767
K4	0.76	1.118	0.939
K5	1.112	0.966	1.039
K6	0.907	0.88	0.8935
K7	0.901	0.953	0.927
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ Α.Σ			
ΘΕΣΠΡΩΤΙΑΣ	1.774	1.764	1.769
ΤΡΟΦΗ ΓΙΑ ΜΙΚΡΑ			
ΚΟΤΟΠΟΥΛΑ	1.992	1.849	1.9205
ΠΙΤΗΡΑ ΣΙΤΟΥ ΨΙΛΑ			
(ΒΗΤ)	1.811	1.602	1.7065
ΤΡΟΦΗ ΓΙΑ			
ΚΟΤΟΠΟΥΛΑ	2.087	1.716	1.9015
ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ ΓΙΑ			
ΧΟΙΡΟΥΣ	1.781	1.794	1.7875
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ			
ΟΛΟΚΛΗΡΟ (Π)	1.67	1.829	1.7495
ΤΡΟΦΗ ΓΙΑ ΚΟΥΝΕΛΙΑ			
(Π)	1.65	1.482	1.566
ΤΡΟΦΗ ΓΙΑ ΚΟΥΝΕΛΙΑ	1.653	1.369	1.511
ΤΡΟΦΗ ΓΙΑ ΜΕΓΑΛΑ			
ΚΟΤΟΠΟΥΛΑ (Π)	1.388	1.486	1.437
ΑΛΕΥΡΩΔΗΣ ΤΡΟΦΗ			
ΓΙΑ ΜΙΚΡΑ			
ΚΟΤΟΠΟΥΛΑΚΙΑ	1.673	1.46	1.5665

Όπως φαίνεται, όλα τα δείγματα θεωρούνται καθαρά, καθώς οι τιμές των συγκεντρώσεων των δειγμάτων σε AFs είναι πολύ μικρότερες από το όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης μεθόδου το οποίο ανέρχεται στα 1,75ppb, συγκέντρωση που δεν ξεπερνά το θεσμοθετημένη από την Ε.Ε για τις AFs στις ζωοτροφές.

3.2 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ

Οι αναλύσεις των δειγμάτων από τις τρεις περιοχές της Ελλάδας, έδειξαν ότι σε κανένα από τα δείγματα δεν ανιχνεύτηκε AFs. Ωστόσο, από το μέσο όρο των συγκεντρώσεων AFs για την κάθε γεωγραφική περιοχή, οι πιο υψηλές τιμές παρότι αμελητέες και ανακριβείς λόγω του ορίου ανίχνευσης, ήταν εκείνος της νοτίου Ελλάδος. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο υπόστρωμα, αφού τα 15 από τα 22 δείγματα που είχαν προέλευση τη νότιο Ελλάδα, είχαν ως βάση τον αραβόσιτο, ο οποίος σύμφωνα με βιβλιογραφικές πηγές αποτελεί τέλειο υπόστρωμα για την ανάπτυξη μυκήτων που παράγουν αφλατοξίνες.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σε μια έρευνα σχετική με την παρουσία μυκοτοξινών σε τρόφιμα της Αφρικής βρέθηκε ότι τα είδη *A. flavus* και *A. parasiticus* είναι από τις πιο συχνές μολύνσεις του αραβόσιτου, που μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή μυκοτοξίνης, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, της συγκομιδής, της αποθήκευσης, της μεταφοράς και της μεταποίησης του αραβόσιτου ^[81].

Επίσης, αυτή η μικρή μόλυνση των δειγμάτων, θα μπορούσε ενδεχομένως να οφείλεται και στις ακατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης, καθώς αναφέρεται στη βιβλιογραφία πως κατά την αποθήκευση των δειγμάτων σε συνθήκες υγρασίας ανώτερες του 85%, σε συνδυασμό με υψηλές θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 25°C ευνοείται η ανάπτυξη μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνη ^[82].

Όσον αφορά τα αποτελέσματα, μια συνολική εκτίμηση για τα επίπεδα των AFs που προσδιορίστηκαν στα δείγματα των ζωοτροφών που προέρχονταν από τη νότια Ελλάδα μπορεί να οφείλεται:

- ✓ Στις κλιματικές συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή από όπου προήλθαν τα δείγματα. ^[83]
- ✓ Στις συνθήκες αποθήκευσης, στις οποίες φυλάσσονταν τα δείγματα πριν την πώλησή ή την κατανάλωσή τους. ^[67]
- ✓ Στο υπόστρωμα του κάθε δείγματος, δηλαδή το βασικό συστατικό του. ^{[64, 65,}

66]

3.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ELISA

Όσον αφορά την εφαρμογή της τεχνικής ELISA για την ανίχνευση AFs σε ζωοτροφές τα συμπεράσματα που μπορούμε να εξάγουμε είναι:

- ✓ Η μέθοδος ELISA αποτελεί μια ταχεία, απλή, εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδος, η οποία είναι η πιο γρήγορη για την ανάλυση μυκοτοξινών, στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές ^[84].
- ✓ Αποτελεί μέθοδο για αναλύσεις ρουτίνας
- ✓ Είναι χαμηλού κόστους μέθοδος
- ✓ Ευαίσθητη
- ✓ Εξειδικευμένη
- ✓ Εύχρηστη
- ✓ Χρησιμοποιεί ειδικά αντισώματα για την ανίχνευση των μυκοτοξινών ^[85].

Ωστόσο, η μέθοδος αυτή, πέρα από τα πολλά πλεονεκτήματα που παρουσιάζει, έχει το μειονέκτημα ότι το εύρος της απόκρισης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποσοτικοποίηση είναι περιορισμένο, για το λόγο αυτό η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συνήθως για να επιβεβαιώσει την παρουσία ή απουσία ενός συστατικού, που μολύνει ούτως ώστε να περιοριστεί η χρήση ακριβότερων μεθόδων ανάλυσης ^[86]. Το φαινόμενο αυτό εξάλλου επιβεβαιώνεται και από τον κατασκευαστή, ο οποίος έχει ορίσει ως κατώτερο όριο ανίχνευσης το 1,75ppb (παράρτημα 1).

3.4 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Οι AFs, αποτελούν μια σημαντική κατηγορία μολυσματικών παραγόντων, που μπορούν να προσβάλουν όχι μόνο τον τομέα των ζωοτροφών, αλλά και των τροφίμων. Σκόπιμη λοιπόν κρίνεται η ανίχνευση αυτών προς αποφυγή των επιδράσεών τους στα ζώα και τον άνθρωπο. Ποικίλες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση των AFs και την ποσοτικοποίηση τους, με διαφορετικά στάδια επεξεργασίας του δείγματος η κάθε μια.

Στην μελέτη αυτή, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια σχετικά νέα μέθοδος προσδιορισμού των AFs, η οποία κατατάσσεται στις ανοσοενζυμικές μεθόδους ανάλυσης. Η μέθοδος αυτή, είναι απλή, ταχεία, οικονομική και αξιόπιστη, με μοναδικό μειονέκτημα το υψηλό όριο ανίχνευσης. Αυτό επιβεβαιώνεται όχι μόνο από την σχετική βιβλιογραφία, αλλά και από τις δοκιμές ανάκτησης που πραγματοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σε μια έρευνα για τον προσδιορισμό των AFs σε ξηρούς καρπούς στην οποία τα δείγματα αναλύθηκαν με την ίδια μέθοδο, το συμπέρασμα στο οποίο κατέληξε η έρευνα ήταν ότι η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανίχνευση των AFs, εξαιτίας της ευαισθησίας, εκλεκτικότητας, ευκολία χρήσης και χαμηλού κόστους ανάλυση ^[87, 88].

Στη χώρα μας, τα όρια που έχει θεσπίσει η Ε.Ε για τις AFs σε ζωοτροφές αφορούν μόνο την AFB1 και το σύνολο των AFs. Ωστόσο, τα επιτρεπτά όρια ποικίλουν ως προς το είδος της ζωοτροφής και τον προορισμό τους. Από τα 45 δείγματα ζωοτροφών, που αναλύθηκαν με τη μέθοδο αυτή, δεν βρέθηκαν δείγματα μη συμμορφωμένα στους κανονισμούς που έχει θεσπίσει η Ε.Ε, σχετικά με την μόλυνση των AFs στις ζωοτροφές. Ωστόσο, ορισμένα δείγματα που προέρχονταν από τη νότιο Ελλάδα έδειξαν μια μικρή αλλά αμελητέα ποσότητα AFs, η οποία μπορεί να οφείλεται σε πολλούς προσυλλεκτικούς και μετασυλλεκτικούς χειρισμούς, στη φύση του υποστρώματος και στις κλιματικές συνθήκες.

Γενικά, αξίζει να σημειωθεί, ότι οι παράγοντες που ευθύνονται για την εμφάνιση των AFs στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές, είναι αρκετά δύσκολο να ελεγχθούν σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, κι αυτό αν αναλογιστούμε ότι για παράδειγμα οι κλιματικές συνθήκες είναι ένας παράγοντας που δεν μπορεί να 'δαμάσει' ο παραγωγός των διαφόρων καλλιεργειών. Εξαιτίας του φαινομένου αυτού,

για να εξαλειφθεί η μόλυνση των καλλιεργειών από AFs και μυκοτοξίνες γενικότερα, θα πρέπει να θεσπιστούν και να εφαρμοστούν αυστηροί, κανόνες και ορθές υποχρεωτικές καλλιεργητικές και μετασυλλεκτικές πρακτικές. Παράλληλα όμως, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, σε μια ερευνά σχετικά με τις AFs στην Ιταλία, είναι αναγκαίο να αυξηθεί η ευαισθητοποίηση των αγροτών όσον αφορά το θέμα των μυκοτοξινών^[89].

Σε αυτήν την κατεύθυνση, χρειάζεται να γίνουν περαιτέρω έρευνες για την διερεύνηση των ακριβών αιτίων εμφάνισης των AFs στις ζωοτροφές. Μερικές από αυτές, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, είναι ο συνεχής έλεγχος των συνθηκών αποθήκευσης των ζωοτροφών καθώς οι συνθήκες που επικρατούν κατά το στάδιο ωρίμανσης τους αλλά και αν αυτές είχαν προσβληθεί από έντομα^[90].

Παρόλα αυτά, όσον αφορά το πρόβλημα των AFs στις ζωοτροφές για την χώρα μας, από τα αποτελέσματα που πήραμε δεν μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι η Ελλάδα διατρέχει η όχι κίνδυνο, εξαιτίας του μικρού αριθμού δειγμάτων και την ευαισθησία της μεθόδου. Για το λόγο αυτό, χρειάζεται να γίνουν περαιτέρω μελέτες, με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, ώστε η γενική εικόνα των AFs για τις ζωοτροφές να ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα, καθώς η παρούσα μελέτη αφορούσε περισσότερο την ανάπτυξη της μεθόδου ανίχνευσης αυτών με ένα ενδεικτικό αριθμό δειγμάτων.

Τέλος, ενδείκνυται τα εν λόγω δείγματα να αναλυθούν και με άλλες πιο εξειδικευμένες μεθόδους π.χ υγρή και αέρια χρωματογραφία, μέθοδοι οι οποίες διαθέτουν πολύ χαμηλότερα όρια ανίχνευσης^[91]. Η πρόταση αυτή, δημιουργήθηκε εξαιτίας πολλών αναφορών από ερευνητές που έκαναν σύγκριση μεθόδων ELISA και χρωματογραφίας και έλαβαν λανθασμένα αποτελέσματα^[92, 93, 94]. Αυτό σε έρευνα σχετικά με τη σύγκριση ανοσοενζυμικών μεθόδων και χρωματογραφίας HPLC για την ανίχνευση AFs^[94]. Από τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής βρέθηκαν δείγματα μολυσμένα με AFs κατά την HPLC ανάλυση, ενώ αντίστοιχα η μέθοδος ELISA δεν κατάφερε να ανιχνεύσει την τοξίνη. Αυτό αποδίδεται στο σχετικά υψηλό όριο ανίχνευσης της μεθόδου ELISA.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1]K.R.N.Reddy,B.Salleh,B.Saad,H.K.Abbas,C.A.Abel,W.T.Shier,ToxinRev.29 (2010)3–26.
- [2]S. Sforza,C.Dall’ Asta, R.Marcheli,MassSpectrom.Rev.25(2006)54–76.
- [3]F.Driehuis,M.C.Spanjer,J.M.Scholten,M.C.TeGiffel,FoodAddit.Contam.B1 (2008)41–50.
- [4]S.D. Upadhaya,M.A.Park,J.K.Ha,J.Anim.Sci.23(2010)1250–1260.
- [5]N. Sultana,N.Q.Hanif,Pak.Vet.J.29(2009)211–213
- [6]O.O.M.,Iheshiulor,B.O.Esonu,O.K.Chuwuka,A.A.Omede,I.C.Okolo, I.P.Ogbuwu,AsianJ.Anim.Sci.5(2011)19–33.
- [7]J.P.Jouany,A.Yiannikouris,G.Bertin,Cent.Int.HautesEtudesAgron.Méditerr.A 85(2009)205–224.
- [8]P. Li, Q. Zhang, W. Zhang, J. Zhang, X. Chen, J. Jiang, L. Xie, D. Zhang, Food Chem. 115 (2009) 313.
- [9]P.Songsermsakul,E.Razzazi-Fazeli,J.Liq.Chromatogr.Relat.Technol.31(2008) 641–1686.
- [10]Rustom, I. Y. S. (1997). Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. Food Chemistry, 59, 57e67.
- [11]Goryacheva IY, De Saeger S, Eremin SA, Van Peteghem C (2007) Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: evolution from single to multiple analyte screening: a review. Food Addit Contam 24:1169–1183
- [12]World Health Organization (WHO) (1979). Guidelines for establishing or strengthening national food contamination monitoring programmes.
- [13]Shephard GS (2003) J Toxicol Toxin Rev 22:267
- [14]Romagnoli, B., Menna, V., Gruppioni, N., & Bergamini, C. (2007). Aflatoxins in spices, aromatic herbs, herb-teas and medicinal plants marketed in Italy. Food Control, 18, 697e701

- [15]Ellis WO, Smith JP, Simpson JP, Oldham JH. 1991. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organism's detection and methods of control. *Crit Rev Food Sci Nutr* 30:403–39.
- [16]Cole, R. J., & Cox, R. H. (1981). *Handbook of toxic fungal metabolites*. New York: Academic Press, ISBN 0-12-179760-0.
- [17]Ali, N., Hashim, N. H., Saad, B., Safan, K., Nakajima, M., & Yoshizawa, T. (2005). Evaluation of a method to determine the natural occurrence of aflatoxins in commercial traditional herbal medicines from Malaysia and Indonesia. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 1763e1772.
- [18]Cho, S. Y., Kang, I. H., Shim, Y. H., Yang, D. H., Oh, S. W., Lee, B. H., et al. (2007). Contamination and detoxification of aflatoxins. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 38, 205e216.
- [19]Bacaloni, A., Cavaliere, C., Cucci, F., Foglia, P., Samperi, R., & Lagana, A. (2008). Determination of aflatoxins in hazelnuts by various sample preparation methods and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1179, 182e189
- [20]Humans, IARC. (1993). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 9e16 June 1992. IARC.
- [21]Stack, J., & Carlson, M. (2003). NF571 *Aspergillus flavus* and aflatoxins in corn, plant diseases, C-18, field crops. Lincoln: Historical Materials from University of Nebraska.
- [22]Hell, K., Cardwell, K. F., & Poehling, H. M. (2003). Relationship between management practices fungal infection and aflatoxin for stored maize in Benin. *Journal of Phytopathology*, 151, 690e698.
- [23]E.O'Brien, D.R.Dietrich Ochratoxin A: The Continuing Enigma, , *Critical Reviews in Toxicology*, 35:33–60, (2005)
- [24]Cole, R. J., & Cox, R. H. (1981). *Handbook of toxic fungal metabolites*. New York: Academic Press, ISBN 0-12-179760-0.
- [25]Cornell University (2009), *Aflatoxins: Occurrence and Health Risks, Plants Poisonous to Livestock*, Cornell University Department of Animal Science

- [26]CAST (2003) Mycotoxins; Risks in plant, animal, and human systems. Task force report 139, Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA, 13-157.
- [27]Bankole, S. A., Adeadenus, A. A., Lawal, O. S., & Adesanya, O. O. (2010). Occurrence of aflatoxin B1 in food products derivable from 'egusi' melon seeds consumed in southwestern Nigeria. *Food Control*, 21, 974e976.
- [28]Dini, A., Khazaeli, P., Roohbakhsh, A., Madadlou, A., Pourenamdari, M., Setoodeh, L., et al. (2013). Aflatoxin contamination level in Iran's pistachio nut during years 2009e2011. *Food Control*, 30, 540e544.
- [29]Ezekiel, C. N., Sulyok, M., Babalola, D., Awarth, B., Ezekiel, V. C., & Krska, R. (2013). Incidence and consumer awareness of toxigenic *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin B1 in peanut cake from Nigeria. *Food Control*, 30, 596e601.
- [30]Pacheco, A. M., Lucas, A., Parente, R., & Pacheco, N. (2010). Association between aflatoxin and aflatoxigenic fungi in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30, 330e334.
- [31]Set, E., & Erkmen, O. (2010). The aflatoxin contamination of ground red pepper and pistachio nuts sold in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2532e2537
- [32]Aydin, A., Erkan, M. E., Baokaya, R., & Ciftcioglu, G. (2007). Determination of aflatoxin B1 levels in powdered red pepper. *Food Control*, 18, 1015e1018.
- [33]Liu, B., Hsu, Y., Lu, C., & Yu, F. (2013). Detecting aflatoxin B1 in foods and feeds by using sensitive rapid enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip. *Food Control*, 30, 184e189.
- [34]Bryden WL. 2007. Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asian Pac J Clin Nutr*. 16:95–101.
- [35]CAST (Council for Agricultural Science and Technology). 2003. Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. Task Force Report No. 139. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, IA.
- [36]Huwig A, Freimund S, Käppeli O, Dutler H (2001) Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol Lett* 122:179–188
- [37]Wu F (2006) Economic impact of fumonisin and aflatoxin regulations on global corn and peanut markets. In: Barug D, Bhatnager D, van Egmond HP, van der Kamp JW, van Osenbruggen WA, Visconti A (ed), *The Mycotoxin Factbook*. Food & Feed Topics. Wageningen, The Netherlands.

- [38]Fink-Gremmels J, Malekinejad H. 2007. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Anim Feed Sci Technol* 137:326–41.
- [39]Bryden WL, Mycotoxin contamination of the feed supply chain: implications for animal productivity and feed security. *Anim Feed Sci Technol* 173:134–158 (2012).
- [40]Binder EM, Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Anim Feed Sci Technol* 133:149–166 (2007).
- [41]Bryden WL, Mycotoxins and animal production: insidious problems associated with contaminated feedstuffs, in *Proceedings of the International Symposium on Recent Advances in Animal Nutrition*, Kuala Lumpur, Malaysia (2004).
- [42]Πρόγραμμα για την «Ανίχνευση και προσδιορισμό μυκοτοξινών και αφλατοξινών σε καλλιέργειες καλαμποκιού στη Θεσσαλία»
Ημερομηνία ανάκτησης: 23\3\2015
<https://www.trikalaview.gr/πρόγραμμα-για-την-ανίχνευση-και-προσδ/>
- [43]Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr.* 80:1106–1122.
- [44]Bryden WL. 2007. Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asian Pac J Clin Nutr.* 16:95–101.
- [45]Peraica, M., Radic, B., Lucic, A. and Pavlovic, M. (1999) Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(9), 754-766
- [46]Zain ME. 2010. Impact of mycotoxins on humans and animals. *J Saudi Chem Soc* 15:129–44.
- [47]Cardwell KF, Henry SH. 2004. Risk of exposure to mitigation of effects of aflatoxin on human health: a West African example. *J Toxicol.* 23:217–247.
- [48]Sherif, S. O., Salama, E. E. and Abdel-Wahhab, M. A. (2009) Mycotoxins and child health: The need for health risk assessment. *Int J Hyg Environ Health.* 212; 347-368
- [49]Goryacheva IY, Karagusheva MA, Peteghem CV, Sibanda L, Saeger SD (2009) Immunoaffinity pre-concentration combined with oncolumn visual detection as a tool for rapid aflatoxin M1 screening in milk. *Food Control* 20:802–806
- [50]Osweiler, G. (2005) Aflatoxins and animal health. Iowa State University.

- [51]Agag, B. I. (2004) Mycotoxins in food and feeds-Aflatoxins. Ass. Univ. Bull. Environ. Res. 7(1), 173-206
- [52]Pennington, J. A. (2009) Aflatoxin M1 in Milk. University of Arkansas/Division of Agriculture.
- [53]ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) αριθ. 574/2011 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 16ης Ιουνίου 2011 «σχετικά με τις ανεπιθύμητες ουσίες στις ζωοτροφές»
- [54]Bacaloni, A., Cavaliere, C., Cucci, F., Foglia, P., Samperi, R., & Lagana, A. (2008). Determination of aflatoxins in hazelnuts by various sample preparation methods and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1179, 182e189.
- [55]Miraglia, M., Marvin, H. J. P., Kleter, G. A., Battilani, P., Brera, C., Coni, E., et al. (2009). Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology*, 47(5), 1009–1021.
- [56]CAST. (2003). Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. Ames IA, Council for Agricultural Science and Technology.
- [57]Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. *EFSA J.* **2004**, 39, 1–27.
- [58]Magan, N., Medina, A. and Aldred, D. (2011) Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre-and postharvest. *Plant Pathol.* 60, 150-163
- [59]O Brian, G. R., Georgianna, D. R., Wilkinson, J. R., Yu, J., Abbas, H. K., Bhatnagar, D. et al. (2007) The effect of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis. *Mycologia* 99(2), 232-239
- [60]Paterson, M R. R. and Lima, N. (2010) How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Res Int.* 43, 1902-1914
- [61]Tassou, C. C., Natskoulis, P. I., Panagou, E. Z., Spiropoulos, A. E., Magan, N. (2007) Impact of water activity and temperature on growth and ochratoxin A production of two *Aspergillus carbonarius* isolates from wine grapes in Greece. *J Food Protect* 70(12), 2884-2888
- [62]Bhat R, Rai RV, Karim A. 2010. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Rev Food Sci Food Saf* 9:57–81.
- [63]Jouany, J. P. (2007) Methods for preventing, decontaminating and minimizing

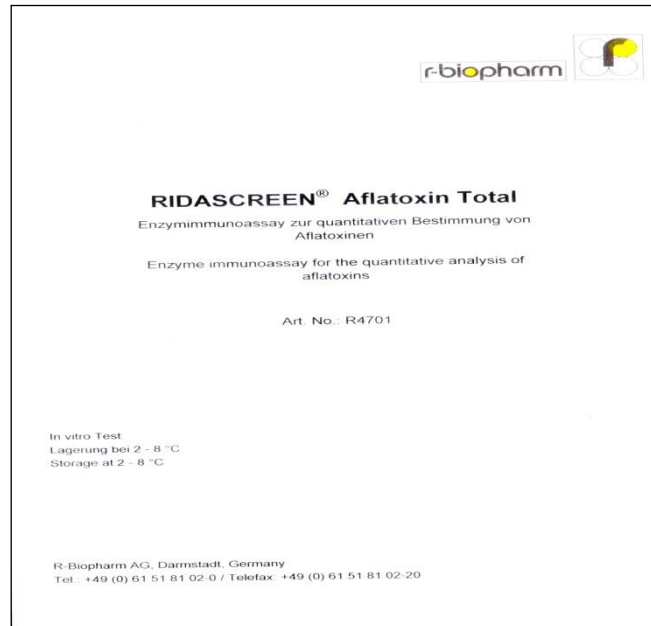
- the toxicity of mycotoxins in feeds. *Anim Feed Sci Tech.* 137, 342-362
- [64]EFSA (2012) Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. Scientific Report submitted to the European Food Safety Authority, 1-172.
- [65]Creppy, E. E. (2002) Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett.* 127, 19-28
- [66]Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I. et al. (2012) Current Situation of Mycotoxin Contamination and Co-occurrence in Animal Feed-Focus on Europe. *Toxins* 4, 788-809
- [67]Magan, N. and Aldred, D. (2007) Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *Inte J Food Microbiol.* 119, 131–139
- [68]Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M. and Piva, G. (2009a) On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem Toxicol.* 47(5), 984-991
- [69]A.J.Tüdös, E.R.Bos, ECA Rapid surface plasmon resonance-based inhibition assay of deoxynivalenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, pp. 5843-5848, (2003)
- [70]Kim E. Sapsford, et al. (2006) Indirect competitive immunoassay for detection of aflatoxin B1 in corn and nut products using the array biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2006) 2298–2305
- [71]Kuby J, “Immunology”, 3rd Edition, W.H. Freeman & Co, New York, pp 156-158, 1997
- [72]Crowther, J. R. (2009) *The ELISA guidebook: 2nd Edition*, Humana press, Springer, N.Y., USA, 1-574
- [73]Li, P., Zhang, Q. and Zhang, W. (2009) Immunoassays for Aflatoxins. *Trend Anal Chem.* 28(9), 1115-1126
- [74]M.M.Ngundi, L.C.Shriver-Lake, M.H.Moore, M.E.Lassman, F.S.Ligler, C.R.Taitt, Array biosensor for detection of ochratoxin A in cereals and beverages. *Analytical Chemistry* 77, pp. 148-154, (2005)
- [75]A.J.Tüdös, E.R.Bos, ECA Rapid surface plasmon resonance-based inhibition assay of deoxynivalenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, pp. 5843-5848, (2003)

- [76]Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr.* 80:1106–1122.
- [77]Lab Trader, Scientific Equipment: Ημερομηνία ανάκτησης: 16/3/2015
<http://www.labtrader.com/absorbance-ultra-microplate-reader-p-674.html>
- [78]Εργαστήριο Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων Τ.Ε.Ι Πελοποννήσου
- [79]ArgaQuant® Mycotoxin ELISA Test Kit, Romer Labs®. Ημερομηνία ανάκτησης: 13/12/14
http://multimedia.3m.com/mws/media/7519470/agraquant-mycotoksin_kits.pdf?&fn=agraquantmycotoxin.pdf
- [80]Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Τμήμα χημείας, Ημερομηνία ανάκτησης: 18/2/2014
<http://www.chem.uoa.gr/courses/instrumental/additional/LOQ-LOD.pdf>
- [81]Bankole, S. A., & Adebajo, A. (2003). Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling. *African Journal of Biotechnology*, 2(9), 254e263.
- [82]U.L. Diener, J. *Stored Prod. Res.*, 5 (1969) 251.
- [83]Ο καιρός στην Ελλάδα. Ημερομηνία ανάκτησης: 5/3/2015
<https://www.weather.gr/ελλάδα/πελοπόννησος/κλίμα-Καλαμάτα-25-16726>
<https://www.weather.gr/ελλάδα/ήπειρος/κλίμα-Ιωάννινα-23-16642>
<https://www.weather.gr/ελλάδα/θεσσαλία/κλίμα-Λάρισα-39-16648>
- [84]Trucksess, M. W. 2001. Rapid analysis (thin layer chromatographic and immunochemical methods) for mycotoxins in foods and feeds. In “Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium.” pp. 29-40. de Koe, W. J.,
- [85]Anfossi, L., Calderara, M., Baggiani, C., Giovannoli, C., Arletti, E., & Giraudi, G. (2008). Development and application of solvent-free extraction for the detection of aflatoxin M1 in dairy products by enzyme immunoassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6), 1852–1857.
- [86]Reeve, R.N. (2002), “Introduction to Environmental analysis”, John Wiley & Sons, Chichester
- [87]Aydin, A., Erkan, M. E., Baokaya, R., & Ciftcioglu, G. (2007). Determination of aflatoxin B1 levels in powdered red pepper. *Food Control*, 18, 1015e1018.

- [88]Liu, B., Hsu, Y., Lu, C., & Yu, F. (2013). Detecting aflatoxin B1 in foods and feeds by using sensitive rapid enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip. *Food Control*, 30, 184e189.
- [89]Piva, G.; Battilani, P.; Pietri, A. Emerging issues in southern Europe: Aflatoxins in Italy. In *The Mycotoxin Factbook, Food and Feed Topics*; Barug, D., Bhatnagar, D., Eds.; Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands, 2006; pp. 139–153.
- [90]Sahindokuyucu Kocasari F., Numan Oguz M., Karakas Oguz F., Mor F., Occurrence of mycotoxins in feed samples in Burdur Province, Turkey., Springer Science+Business Media Dordrecht 2012., *Environ Monit Assess* (2013) 185:4943 4949
- [91]Barna-Vetro, I., Solti, L., Turen, J., Gyöngyösi, A., Szabo, E., & Wölfing, A. (1996). Sensitive ELISA test for the determination of ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 4071–4074.
- [92]Beaver, R. W., James, M. A., & Lin, T. Y. (1991). Comparison of an ELISA based screening test with liquid chromatography for the determination of aflatoxins in corn. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 74, 827–829.
- [93]Bosch, H., Tessin, N., Bellmer, H.-G., & Bassler, H. M. S. (1994). Evaluation of the suitability of enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs) for mycotoxins analysis in the brewing industry. *Monatsschrift für Brauerei*, 47, 196–202.
- [94]Krska, R., & Fresenius, J. R. (2001). The state-of-the-art in the analysis of estrogenic mycotoxins in cereals. *Journal of Analytical Chemistry*, 369, 469–476.
- [95]Carolina Nachi Rossi, Cassia Reika Takabayashi, Mario Augusto Ono, Gervasio Hitoshi Saito, Eiko Nakagawa Itano, Osamu Kawamura, Elisa Yoko Hirooka, Elisabete urie Sataque Ono. Immunoassay based on monoclonal antibody for aflatoxin detection in poultry feed. *Food Chemistry*., 132 (2012) 2211–2216

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1. ΟΔΗΓΙΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗ



RIDASCREEN® Aflatoxin Total									
<p>Brief information</p> <p>RIDASCREEN® Aflatoxin Total (Art. No.: R4701) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxins in cereals and feed. All reagents required for the enzyme immunoassay - including standards - are contained in the test kit. The test kit is sufficient for 96 determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.</p> <p>Sample preparation: cereals and feed: extraction, filtration and dilution</p> <p>Time requirement: sample preparation (for 10 samples) cereals and feed approx. 30 min test implementation (incubation time) 45 min</p> <p>Detection limit: (corresponding to the standard substance) cereals and feed: approx. 1.75 ppb</p> <p>Recovery rate: (corresponding to the standard substance) approx. 85 % coefficient of variation: 15 %</p> <p>Cross reactivity: The specificity of the RIDASCREEN® Aflatoxin Total test was established by analyzing the cross-reactivity to corresponding mycotoxins in buffer system.</p> <table style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>Aflatoxin B1</td> <td>100 %</td> </tr> <tr> <td>Aflatoxin B2</td> <td>approx. 48 %</td> </tr> <tr> <td>Aflatoxin G1</td> <td>approx. 75 %</td> </tr> <tr> <td>Aflatoxin G2</td> <td>approx. 18 %</td> </tr> </table>	Aflatoxin B1	100 %	Aflatoxin B2	approx. 48 %	Aflatoxin G1	approx. 75 %	Aflatoxin G2	approx. 18 %	<p>1. Intended use</p> <p>RIDASCREEN® Aflatoxin Total is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxins in cereals and feed.</p> <p>2. General</p> <p>Aflatoxins are secondary metabolites of the fungi species <i>Aspergillus flavus</i>, <i>parasiticus</i> und <i>nomius</i>. These fungi occur in humid tropical areas and the contamination of vegetable food takes place in the cultivable countries. Aflatoxins belong to the strongest natural occurring cancerogenic substances. Aflatoxin B₁ which is mostly found together with the aflatoxins B₂, G₁ and G₂ is the one with the highest toxic importance. It is found above all in corn, peanuts, brazil nuts, cotton seed and pistachios. Depending on the toxicity of these mycotoxins in the countries of the EU equal limits are valid for aflatoxins, 2 ppb for aflatoxin B₁ and 4 ppb for all aflatoxins in total in cereals.</p> <p>3. Test principle</p> <p>The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The wells in the microtiter strips are coated with capture antibodies directed against anti-aflatoxin antibodies. Standards or the sample solutions, aflatoxin-enzyme conjugate and anti-aflatoxin antibodies are added. Free and enzyme conjugated aflatoxin compete for the aflatoxin antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). At the same time, the anti-aflatoxin antibodies are also bound by the immobilized capture antibodies. Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. Substrate/chromogen solution is added to the wells and incubated. Bound enzyme conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm; the absorption is inversely proportional to the aflatoxin concentration in the sample.</p>
Aflatoxin B1	100 %								
Aflatoxin B2	approx. 48 %								
Aflatoxin G1	approx. 75 %								
Aflatoxin G2	approx. 18 %								
10	RIDASCREEN® Aflatoxin Total 10-11-18	RIDASCREEN® Aflatoxin Total 10-11-18	11						

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for 96 measurements (including standard analyses). Each test kit contains:

- 1 x Microtiter plate with 96 wells (12 strips with 8 wells each)
coated with capture antibodies
- 6 x Aflatoxin standards (1.3 ml each)
0 ppb (zero standard), 0.05 ppb, 0.15 ppb, 0.45 ppb, 1.35 ppb, 4.05 ppb
aflatoxin B₁ methanol/water, ready to use
- 1 x Conjugate (6 ml) red cap
peroxidase conjugated aflatoxin B₁
ready to use
- 1 x Anti-aflatoxin antibodies (6 ml) black cap
monoclonal, ready to use
- 1 x Red Chromogen Pro (10 ml) brown cap
(Substrate/chromogen solution), stained red
contains tetramethylbenzidine
- 1 x Stop solution (14 ml) yellow cap
contains 1 N sulfuric acid
- 1 x Buffer salt (washing buffer)
for preparation of a 10 mM Phosphate Buffer (pH 7.4)
contains 0.05 % Tween 20

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- grinder (mill)
- shaker
- funnel and paper filter
- graduated pipettes
- variable 20 µl - 200 µl- and 200 - 1000 µl-micropipettes

5.2. Reagents:

- methanol
- 70 % methanol solution: mix 70 ml methanol (100 %) with 30 ml distilled water
- distilled water

6. Warnings and precautions for the users

This test should only be carried out by trained laboratory employees. The instruction for use must be strictly followed.

The standard solutions contain aflatoxin B₁, particular care should be taken. Avoid contact of the reagent with the skin (use gloves).

Decontamination of the glassware and toxin-content solutions is best carried out using a sodium hypochlorite (bleach) solution (10 %; v/v) overnight (adjust solution with HCl to pH 7).

The stop solution contains 1 N sulfuric acid (R36/38, S2-26).

7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Do not freeze any test kit components.

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

Aflatoxins are light-sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

The reddish substrate/chromogen solution is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after the expiration date on the kit label.

Do not interchange individual reagents between kits of different lot numbers.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- any bluish coloration of the reddish substrate/chromogen solution prior to test implementation
- a value of less than 0.6 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.6$) for the zero standard

9. Preparation of Samples

The samples should be stored in a cool place, protected against light.

9.1. Cereals and feed

A representative sample is triturated and thoroughly mixed in a mixer.

- weigh 2 g of the ground sample into a screw cap glass vial
- add 10 ml of methanol / distilled water (70/30, v/v) and mix for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) using a shaker
- filter entire extract by using a paper filter
- dilute 100 µl of the filtrate with 600 µl distilled water
- employ 50 µl per well in the assay

Remark:

If the aflatoxin concentration is expected to exceed 120 ppb, the further sample dilution has to be done in distilled water containing 10 % methanol (i.e. 9 ml distilled water + 1 ml methanol (100 %)). Any kind of sample being used in the assay has to be provided in distilled water with 10 % methanol.

The filtrate can be stored at 2 - 8 °C for two weeks and at -20 °C for two months. Store well sealed in glass vials (brown-glass) and protected against light.

It is also possible to employ other food samples, but our experience shows that for example nuts, herbs, spices and tea leaves create too high background effects without immunoaffinity columns for sample preparation. For these food samples please order the product information of the RIDA® Aflatoxin column (R5001 / R5002) by your local distributor.

An application note for green coffee in combination with RIDA® Aflatoxin column (R5001 / R5002) is available on request. Please contact your local distributor.

Please note, that for the sample preparations with RIDA® Aflatoxin column (R5001 / R5002) the respective eluates have to be diluted 1:10 with distilled water. For all further dilutions the use of distilled water with 10 % methanol is absolutely essential.

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use.

As washing buffer a PBS tween buffer is needed. Please use the buffer salt contained in the kit (see 4.). Dissolve the entire buffer salt in one liter of distilled water. The ready to use washing buffer expires after approx. 4 - 6 weeks at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

Alternative: Dissolve the contents of the envelope in 100 ml of distilled water to obtain a 10fold concentrated washing buffer. Use 1 part of this concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use washing buffer. The 10fold concentrate expires after approx. 8 - 12 weeks, store at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

10.2. Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure. Do not allow microwells to dry between working steps.

1. Insert a sufficient number of microtiter wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 50 µl of the standard solutions or prepared sample to separate duplicate wells.
3. Add 50 µl of the enzyme conjugate to each well.
4. Add 50 µl of the antibody solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
5. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl washing buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat the washing procedure two times.
6. Add 100 µl of substrate/chromogen (brown cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C; 68 - 77 °F) in the dark.
7. Add 100 µl of the stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 30 minutes after addition of stop solution.

14

RIDASCREEN® Aflatoxin Total 10-11-18

RIDASCREEN® Aflatoxin Total 10-11-18

15

11. Results

A special software, the RIDA®SOFT Win (Art. No. Z9999), is available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays.

The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit.

Remark for the calculation without software:

$$\frac{\text{absorbance standard (or sample)}}{\text{absorbance zero standard}} \times 100 = \% \text{ absorbance}$$

The zero standard is thus made equal to 100 % and the absorbance values are quoted in percentages. The values calculated for the standards are entered in a system of coordinates on semilogarithmic graph paper against the aflatoxin concentration [ng/kg].

In order to obtain the aflatoxin concentration in ng/kg actually contained in a sample, the concentration read from the calibration curve must be further multiplied by the corresponding dilution factor. When working in accordance with the regulation stated, the dilution factor is as follows:

cereals and feed 35

R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. If any materials are defective, R-Biopharm will provide a replacement product. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

RIDASCREEN® Aflatoxin Total 10-11-18

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2015