

# Studija o nalazu aflatoksina u hrani za životinje i sirovom mleku u Srbiji tokom 2013. godine

Danka M. Spirić, Srđan M. Stefanović, Tatjana M. Radičević, Jasna M. Đinović Stojanović, Vesna V. Janković, Branko M. Velebit, Saša D. Janković

Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Kačanskog 13, Beograd, Srbija

## Izvod

Vremenski i klimatski uslovi koji su bili atipični za umereno kontinentalno proleće i leto 2012. godine smatraju se jednim od razloga kontaminacije useva mikotoksinima u Srbiji. Upotreba hrane za životinje poreklom iz žetve 2012. god. za posledicu je imala pojavu aflatoksina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) u mleku krava. Kvantitativni ELISA testovi korišćeni su za analizu uzoraka hraniva, odnosno mleka. Konfirmacija pozitivnih rezultata dobijenih imunoenzimskim testom obavljena je pomoću UPLC-MS/MS metoda. Od 281 uzorka potpunih smeša za ishranu krava muzara, 67 uzoraka (24%) je sadržalo aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) u koncentraciji većoj od vrednosti MDK (maksimalno dozvoljena količina) od 0,005 mg/kg [4]. Uzorci kukuruza su, takođe, ispitani na prisustvo AFB<sub>1</sub> i utvrđena je kontaminacija 22% uzoraka iznad vrednosti maksimalno dozvoljene količine (0,03 mg/kg). Uzorci druge vrste hraniva, kao što su suncokretova sačma, seno, kukuruzna silaža i repini rezanci bili su negativni na prisustvo aflatoksina B<sub>1</sub>. Sadržaj AFM<sub>1</sub> u 934 „skrinin“ pozitivna uzorka je bio u opsegu 0,005–1,25 µg/kg. Najviši stepen kontaminacije zabeležen je tokom marta 2013, kada je 65% ispitanih uzoraka mleka sadržalo više od 0,05 µg/kg, a 13% više od 0,5 µg/kg aflatoksina M<sub>1</sub>.

**Ključne reči:** aflatoksin B<sub>1</sub>, aflatoksin M<sub>1</sub>, hrana za životinje, mleko, ELISA, UPLC-MS/MS.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

NAUČNI RAD

UDK 613.287:615.9(497.11)“2013“

Hem. Ind. 69 (6) 651–656 (2015)

doi: 10.2298/HEMIND140619087S

Mikotoksini su sekundarni metaboliti toksikogenih plesni, značajni zbog toksičnih efekata koje ispoljavaju kada dospeju u organizam ljudi ili životinja.

Od poznatih mikotoksina, najveću toksičnost ispoljava AFB<sub>1</sub> koji, prema kriterijumima Ekonomske komisije Ujedinjenih nacija za Evropu (*United Nations Economic Commission for Europe*) [1], spada u supstance sa akutnim toksičnim delovanjem prve kategorije, u slučaju oralne i perkutane ekspozicije. U supstance prve kategorije, prema ovoj klasifikaciji spadaju jedinjenja čiji je LD<sub>50</sub> do 5 mg/kg TM u slučaju oralne ekspozicije i do 50 mg/kg TM u slučaju perkutane ekspozicije (Tabela 1). Usled kumulativnog delovanja u organima, AFB<sub>1</sub> je označen kao kancerogena supstanca za ljude i

svrstan u grupu 1A, prema Internacionalnoj agenciji za istraživanje o raku (IARC, 2002) [2]. Prema postojećim zakonskim regulativama koje se odnose na mikotoksine u žitaricama u našoj zemlji, najniža MDK je određena za aflatoksin B<sub>1</sub> i iznosi 0,005 mg/kg za žita namenjena ljudskoj ishrani [3] i 0,03 mg/kg za hranu namenjenju ishrani životinja) [4].

Kontaminacija mikotoksinima nastaje u različitim fazama rasta biljke, sazrevanja ploda, ili neodgovarajućeg skladištenja nakon žetve. Iako su tropski klimatski uslovi najpovoljniji za pojavu aflatoksina u žitaricama i orašastim plodovima, promene klimatskih uslova u vidu sve dužih perioda sa visokim dnevnim minimalnim temperaturama, dovode do povećanja rizika za pojavu

Tabela 1. Kategorizacija supstanci prema akutnoj toksičnosti i procenjene granične vrednosti za akutnu toksičnost. Akutna toksičnost se izražava kao LD<sub>50</sub>. (deo tabele, izvor: GHS [1])

Table 1. Acute toxicity hazard categories and acute toxicity estimate (ATE) values defining the respective categories. Acute toxicity is expressed as LD<sub>50</sub>. (part of the table, source: GHS [1])

Put unošenja	Kategorija				
	1	2	3	4	5
Oralni (mg/kg T. M.)	5	50	300	2000	5000
Perkutani (mg/kg T. M.)	50	200	1000	2000	5000

Prepiska: D. Spirić, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Kačanskog 13, 11000 Beograd, Srbija.

E-pošta: dankaspiric@inmesbgd.com

Rad primljen: 19. jun, 2014

Rad prihvaćen: 15. decembar, 2014

mikotoksina i u umerenom pojasu [5]. Visoke prosečne temperature i dug sušni period izazivaju toplotni stres kod biljaka, pri čemu dolazi do kontaminacije biljke plesnima roda *Aspergillus*, naročito u periodu cvetanja kukuruza i tamnjenja kukuruzne svile [6,7].

Pored rotacije useva [8], kao načina smanjenja rizika od kontaminacije plesnima i mikotoksinima u polju, od izuzetne važnosti za prevenciju pojave mikotoksina su i uslovi skladištenja, nakon žetve. Sortiranje i sušenje semena su važni parametri za sprečavanje naknadne kontaminacije žitarica mikotoksinima [9,10].

U toku 2012. godine, na osnovu izveštaja RHMZ, u Srbiji je zabeležena suša, koja je naročito loše uticala na poljoprivredne kulture tokom juna meseca [11]. Visoke vrednosti minimalne dnevne temperature i visoke vrednosti prosečnih temperatura povoljno su uticale na kontaminaciju klipova kukuruza mikotoksikogenim plesnima *Aspergillus flavus* u polju.

Početkom 2013. godine, usled upotrebe kontaminiranog kukuruza, zabeležena je pojava povećanog sadržaja AFB<sub>1</sub> u hrani za životinje, što je za posledicu imalo povećan sadržaj AFM<sub>1</sub> u mleku mlečnih krava. Praćenje kontaminacije uzoraka sa farmi, u periodu od februara do aprila 2013. godine, imalo je za cilj da se utvrdi stepen kontaminacije hrane za životinje i mleka krava aflatoksinima. Na ovaj način su obezbeđeni podaci subjektima u poslovanju potrebni za procenu rizika i bezbednost hrane [12]. Takođe, uvid u stepen kontaminacije hrane za životinje i mleka važan je parametar za procenu ekonomskog gubitka mlečne industrije i farmi [13].

## MATERIJAL I METODE

U toku 2013. godine, u periodu od februara do aprila, uzorkovano je 396 različitih uzoraka hrane za životinje, namenjene ishrani mlečnih krava, i to: 281 uzorak potpunih smeša za ishranu mlečnih krava, 55 uzoraka kukuruza, odnosno kukuruzne prekrupe, i po 12 uzoraka silaže, sojine sačme, deteline, sena i suncekretove sačme, i ispitano na prisustvo i sadržaj aflatoksina B<sub>1</sub>. Ukupno 2.045 uzorka sirovog kravljeg mleka ispitano je na prisustvo i sadržaj aflatoksina M<sub>1</sub>. Uzorci su bili deo pojačane kontrole farmi mlečnih krava i otkupnih stanica.

Za obe ELISA metode korišćen je spektrofotometar Multiskan Ascent, ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, SAD). Priprema uzoraka hrane za životinje obavljena je u skladu sa dokumentovanim metodom prema uputstvu proizvođača (Tecna, Trst, Italija). Korišćen je metanol p.a. čistoće (Sigma, St. Louis, SAD). Uzorci hrane za životinje ispitani su ELISA metodom sa limitom detekcije od 0,001 mg/kg, za AFB<sub>1</sub>. Kao interna kontrola korišćeni su: slepa proba (blanko uzorak), i četiri obogaćene slepe probe u koncentracijama od 0,00; 0,010; 0,030 i 0,050 mg/kg AFB<sub>1</sub>.

Metoda za određivanje sadržaja aflatoksina B<sub>1</sub> je direktni kompetitivni ELISA test. Tokom predinkubacije, ekstrakti uzoraka se mešaju sa peroksidazom rena (*horse radish peroxidase* – HRP), enzimom, koji je konjugovan sa aflatoksinom i zajedno se dodaju u mikro-

titarske bunarčiče, obložene anti-aflatoksin antitelima, za koje se kompetitivno vezuju slobodni i kojugovani aflatoksini [14]. Nakon ispiranja nevezanog sadržaja i inkubacije fiksne količine hromogenog supstrata tetrametilbenzidina (TMB), koji je donor vodonika u reakciji redukcije vodonik peroksida do vode pomoću HRP enzima, dolazi do formiranja proizvoda plave boje. Reakcija se zaustavlja dodavanjem 0,1 M sumporne kiseline, koja inaktivira HRP enzim, a proizvod postaje žuto obojen. Intenzitet boje se očitava na talasnoj dužini od 450 nm.

Za određivanje AFB<sub>1</sub>, tečnom hromatografijom ultra performansi sa masenom spektroskopijom (UPLC/MS-MS), deset grama samlevenog i homogenizovanog zrna kukuruza je odmereno na tehničkoj vagi i preliveno sa 40 mL smeše acetonitril–voda–sirćetna kiselina (79:20:1, V/V/V). Čaše su, zatim, postavljene na orbitalni šejker, a ekstrakcija se odvijala na 150 o/min, tokom jednog časa na sobnoj temperaturi. Uz svaki set uzoraka pripremani su i kontrolni uzorci (jedna slepa proba i tri slepe probe obogaćene AFB<sub>1</sub> u koncentracijama od 0,005; 0,010 i 0,020 mg/kg). Nakon ekstrakcije i taloženja kukuruza na dno čaše, automatskom pipetom je odmereno 500 µL supernatanta kome je dodato 500 µL smeše acetonitril–voda–sirćetna kiselina. Jedan mililitar dobijenog rastvora je profiltriran kroz najlonski špric-filter prečnika pora 0,2 µm direktno u vialu za autosampler. Jonizacija AFB<sub>1</sub> do molekuskog jona se izvodila korišćenjem elektrosprej sistema u pozitivnom modu (ES+). Temperatura jonskog izvora je bila 115 °C a desolvacionog gasa 350 °C. Kapilarni napon je iznosio 4000 V, a napon na konusu 35 V. Kao kolizioni gas korišćen je Ar<sub>2</sub>. Detekcija AFB<sub>1</sub> se izvodila u MRM načinu rada spektrometra, praćenjem masa molekuskog jona (313,1 Da) i tri tranziciona produkta (285,2, 270,1 i 241,1 Da). Kvantifikacioni tranzicioni produkt je bio fragment molekulske mase 285,2 Da.

ELISA metoda za određivanje sadržaja aflatoksina M<sub>1</sub> predstavlja sendvič tip ELISA testa. Mikrotitarski bunarčiči su impregnirani sa anti-aflatoksin M<sub>1</sub> antitelima i tokom prve inkubacije aflatoksin M<sub>1</sub> iz uzoraka se vezuje za antitela. Nakon ispiranja nevezanog materijala, u bunarčiče se dodaje tačno određena količina HRP enzimom konjugovanog aflatoksina M<sub>1</sub>. Konjugat se vezuje za slobodna mesta na impregniranim antitelima. Nakon ispiranja viška materijala, u bunarčiče se dodaje TMB supstrat, koji reaguje sa enzimom i nastaje obojeni proizvod. Nakon dodavanja 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i zaustavljanja reakcije, boja se očitava na spektrofotometru, na talasnoj dužini od 450 nm. Za internu kontrolu korišćeni su slepa proba (blanko uzorak), i tri obogaćene slepe probe u koncentracijama od 0,010; 0,020; 0,050 i 0,075 µg/kg AFM<sub>1</sub>.

Svi uzorci mleka u kojima su ELISA testom dokazane vrednosti AFM<sub>1</sub> 0,050 µg/kg kao i odgovarajući uzorci

kukuruzu u kojima je dokazano više od 30 µg/kg AFB<sub>1</sub>, ispitani su i UPLC/MS-MS metodom.

Za potrebe UPLC/MS-MS mleko je, pre ekstrakcije AFM<sub>1</sub>, podvrgnuto procesu obezmašćivanja. Deset mililitara mleka je preneto u polipropilenske kivete za centrifugu od 50 mL. Kivete su, zatim, prebačene u zamrzivač na –18 °C na 10 min da bi se mleko ohladilo na 1–4 °C. Nakon centrifugiranja, 5 mL obezmašćenog mleka sa dna kivete je preneto u čistu polipropilensku kivetu za centrifugu. Mleku je dodato 100 µL 18% vodenog rastvora sumporne kiseline da bi se postigla pH vrednost od 2±0,5. Zatim je dodato 16 mL acetonitrila i 10 mL *n*-heksana. Dobijena smeša je homogenizovana na vibracionoj mešalici trajanju od 30 s. Aflatoksin M<sub>1</sub> je zatim ekstrahovan na orbitalnom šejkeru 10 min na 150 o/min, nakon čega su kivete postavljene u centrifugu i uzorci centrifugirani 15 min na 4000 o/min. Staklenom pipetom je odbačen gornji sloj *n*-heksana. Acetonitrilski sloj je dekantovan u staklene balone za uparavanje. Acetonitril je uparen na vakuum uparivaču na 60 °C, do suva. Suvi ostatak je rekonstituisan u 2 mL acetonitrila i prenet, nakon filtriranja kroz špric filter veličine pora 0,22 µm, direktno u vialu za autosampler.

UPLC-MS/MS instrument se sastoji od Waters Acquity UPLC sistema (Waters, Milford, MA, SAD) sa kvaternarnom pumpom, autosamplerom, grejačem kolone i tripl kvadripol masenim spektrometrom „TQD” (Waters Micromass, Manchester, Velika Britanija). Hromatografija je izvedena na Merck (Darmstadt, Nemačka) Purospher Star RP-18, reverzno-faznoj koloni (50 mm×2,1 mm), veličina čestica 2 µm. Mobilna faza se sastojala od 0,1 % sirćetne kiseline u vodi i metanola u odnosu 40:60, V/V. Protok je bio izokratni i iznosio je 0,25 mL/min. Separacija na hromatografskoj koloni se odvijala na 30±1 °C. Temperatura uzoraka u autosempleru je održavana na 20±1 °C.

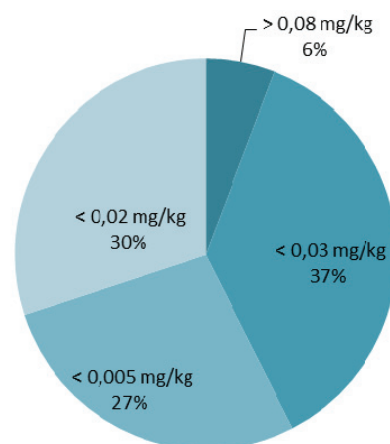
Kalibracija se izvodila u pet tačaka, uključujući i nulu. Limit detekcije metode je 0,5 µg/kg za AFB<sub>1</sub> i 0,02 µg/kg za AFM<sub>1</sub>. Aflatoksin M<sub>1</sub> je detektovan praćenjem masa molekulskog jona (329 Da) i dva tranziciona produkta (273 i 259,1 Da). Kvantifikacioni tranzicioni produkt je bio fragment molekulske mase 259,1 Da. Akvizicija i obrada podataka obavljena je MassLynx 4.1 softverom proizvođača Waters.

Rezultati dobijeni ELISA metodom su interpretirani korišćenjem „spreadsheet” programa autorizovanog od strane proizvođača kitova. Modelom regresione analize utvrđena je veza između rezultata dobijenih ELISA i UPLC/MS-MS metodom.

## REZULTATI I DISKUSIJA

Od ukupno 281 uzorka potpune krmne smeše za ishranu mlečnih krava više od 0,005 mg/kg aflatoksina B<sub>1</sub> utvrđeno je u 67 uzoraka.

Od 55 ispitanih uzoraka kukuruza i kukuruzne prekrupe, 11 uzoraka je imalo vrednost AFB<sub>1</sub> iznad propisane MDK od 0,03 mg/kg [4], a 19 uzoraka je imalo više od 0,02 mg/kg aflatoksina B<sub>1</sub>, što je vrednost MDK koja je određena evropskim propisima [15]. Ovakva zastupljenost aflatoksina B<sub>1</sub> u kukuruzu u skladu je sa sličnim nalazima drugih autora za mikotoksine u kukuruzu iz žetve iz 2012. godine [16]. Stepent kontaminacije kukuruza, na osnovu različitih kriterijuma i propisanih MDK, prikazan je na slici 1.



Slika 1. Rezultati ispitivanja uzoraka kukuruza na prisustvo aflatoksina B<sub>1</sub> (mg/kg) u periodu februar–april 2013, prema kriterijumima različitih pravilnika.

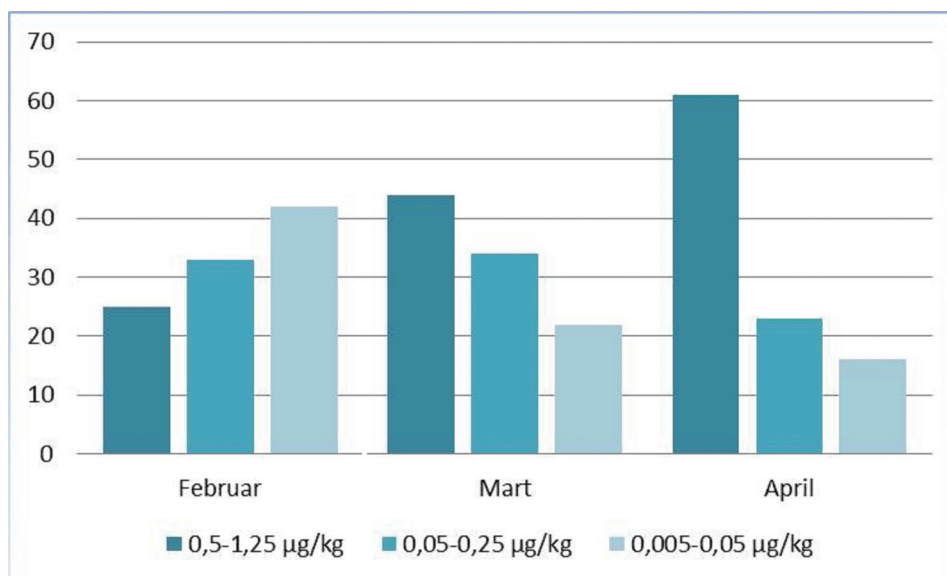
Figure 1. Data for the presence of aflatoxin B<sub>1</sub> (mg/kg) in the maize samples during February–April 2013, according to the criteria of different regulations.

U preostalih 60 uzoraka kukuruzne silaže, sojine pogače, deteline, sena i suncokretove sačme nije utvrđeno prisustvo aflatoksina B<sub>1</sub>. Na osnovu toga može se zaključiti da se kontaminacija odnosila samo na kukuruz i kukuruznu prekrupu, koji su osnovni sastojci potpune smeše za ishranu krava.

Od 2.045 ispitanih uzoraka sirovog mleka, u 934 ispitana uzorka utvrđeno je prisustvo AFM<sub>1</sub> iznad limita kvantifikacije metode (0,005 µg/kg). U zavisnosti od primenjenih kriterijuma za vrednosti MDK od 0,05 [17] i 0,25 µg/kg [18], na slici 2 prikazana je distribucija pozitivnih uzoraka.

Rezultati ispitivanja uzoraka sirovog mleka sa teritorije Srbije drugih autora pokazali su sličnu procentualnu zastupljenost AFM<sub>1</sub> [19], a rezultati ispitivanja prisustva aflatoksina u mleku koje iznose autori iz okolnih zemalja [20] ukazuju da je problem kontaminacije žitarica u 2012. godini i posledično, sirovog mleka bio problem regionalnog karaktera.

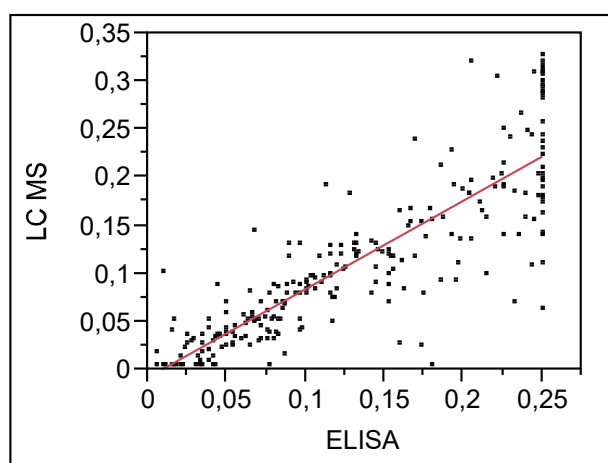
Kada se uzme u obzir odnos između rezultata ispitivanja stepena kontaminacije aflatoksinima hraniva i mleka dobija se slaba korelaciona veza [21]. Objašnjenje za ovu pojavu leži u činjenici da je AFB<sub>1</sub> u kukuruzu raspoređen veoma heterogeno što je dobro doku-



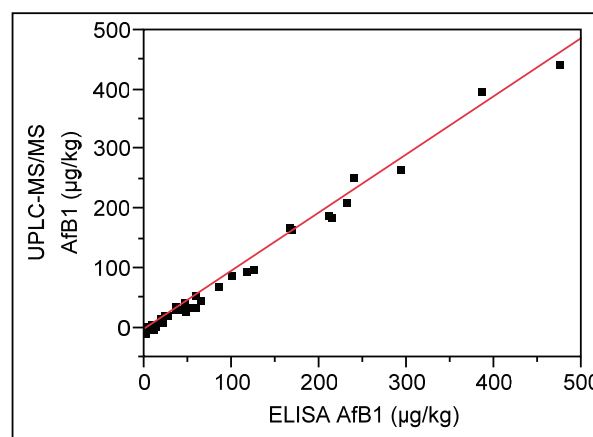
Slika 2. Procentualna zastupljenost tri nivoa rezidua aflatoksina  $M_1$  u uzorcima sirovog mleka u periodu februar–april 2013.  
Figure 2. Percentage of three levels of aflatoxin  $M_1$  presence in raw milk samples during the period February–April 2013.

mentovano u dostupnoj naučnoj literaturi [22]. Sa druge strane,  $AFM_1$  je u mleku pravilno distribuiran. Stoga je način uzorkovanja kukuruza od velike važnosti za dobijanje reprezentativnog uzorka [23].

Poređenjem rezultata dobijenih ELISA i UPLC/MS-MS metodom utvrđen je stepen korelacije  $R^2 = 0,75$ , za aflatoxin  $M_1$  i  $R^2 = 0,99$ , za aflatoxin  $B_1$ , što je prikazano na slikama 3 i 4. Sa grafikona se može videti veći stepen korelacije metoda za  $AFB_1$  u odnosu na  $AFM_1$ . Objašnjenje za ovu pojavu leži u činjenici da su nivoi  $AFM_1$  za dva reda veličine manji od merenih nivoa  $AFB_1$ , te je i relativna standardna devijacija rezultata  $AFM_1$  veća, međutim, može se reći da obe analitičke tehnike pokazuju visok stepen korelacije.



Slika 3. Regresiona prava korelacije između ELISA i UPLC-MS/MS metode za određivanje  $AFM_1$  u mleku.  
Figure 3. Regression correlation curve between ELISA and UPLC-MS/MS method for determination of  $AFM_1$  content in milk.



Slika 4. Regresiona prava korelacije između ELISA i UPLC-MS/MS metode za određivanje  $AFB_1$  u kukuruza.  
Figure 4. Regression correlation curve between ELISA and UPLC-MS/MS method for determination of  $AFB_1$  content in corn.

## ZAKLJUČAK

U ukupno 281 uzorku potpunih krmnih smeša i 55 uzoraka kukuruza utvrđen je određeni stepen kontaminacije aflatoxinima koji ukazuje da 24%, odnosno 20% ispitanih uzoraka ne ispunjava zahteve Pravilnika o kvalitetu hrane za životinje. Tokom tromesečnog perioda ispitivanja uzoraka sirovog mleka utvrđeno je da je najveći stepen kontaminacije bio u martu 2013. godine, kada je 65% uzoraka bilo kontaminirano aflatoxinom  $M_1$  iznad propisane MDK vrednosti u Evropi, a 13% uzoraka je imalo sadržaj aflatoksina  $M_1$  deset i više puta veću od 0,5 µg/kg [3].

## Zahvalnica

Deo prikazanih rezultata proistekao je iz rada na realizaciji projekta III46009, koji, u okviru istraživanja u oblasti integralnih i interdisciplinarnih istraživanja, finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

## LITERATURA

- [1] Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS), 2013, 5<sup>th</sup> rev. ed., [http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/English/ST-SG-AC10-30-Rev5e.pdf](http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/English/ST-SG-AC10-30-Rev5e.pdf).
- [2] ARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, Vol. 82, Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France, 2002.
- [3] Pravilnik 1: Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja (Sl. glasnik RS br. 25/10 i Sl. glasnik RS br. 28/11)
- [4] Pravilnik 2: Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje (Sl. Glasnik RS br. 4/10, 113/12 i 27/14).
- [5] R. Russell, M. Paterson, N. Lima, How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Res. Int.* **43** (2010) 1902–1914.
- [6] S.F. Marsh, G.A. Payne, Preharvest infections of Corn silks and kernels by *Aspergillus flavus*, *Phytopathology* **74** (1984) 1284–1289.
- [7] S.D. Kocić-Tanackov, G.R. Dimić, Gljive i mikotoksini – kontaminanti hrane, *Hem. Ind.* **67** (2013) 639–653.
- [8] R. Jaime-Garcia, P.J. Cotty, Crop rotation and soil temperature influence the community structure of *Aspergillus flavus* in soil, *Soil Biol. Biochem.* **42** (2010) 1842–1847.
- [9] P.J. Cotty, R. Jaime-Garcia, Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination, *Int. J. Food Microbiol.* **119** (2007) 109–115.
- [10] N.M.M. Birck, I. Lorini, V.M. Scussel, Fungus and mycotoxins in wheat grain at post harvest, 9<sup>th</sup> International Working Conference on Stored Product Protection, Brazil, 2006, PS2-12 – 6281, pp. 195–205.
- [11] Klimatološka analiza 2012. godine na teritoriji republike Srbije, Republički hidrometeorološki zavod Srbije, 2012. <http://www.hidmet.gov.rs/podaci/meteorologija/latin/2012.pdf>.
- [12] V. Janković, M. Škrinjar, J. Vukojević, D. Karan, M. Radmili, Mikotoksini – potencijalna opasnost za žive organizme, *Tehnologija mesa* **47** (2006) 97–103.
- [13] D. Milićević, Mycotoxins in food chain, old problems new solutions, *Tehnologija mesa* **50** (2009) 99–111.
- [14] P. Li, Q. Zhang, W. Zhang, Immunoassays for aflatoxin, *TrAC* **28** (2009) 1115–1126.
- [15] Pravilnik 3: Commission Directive 2003/100/EC. O.J, L **285** (2009) 33–37.
- [16] J. Kos, J. Mastilović, E. Janić Hajnal, B. Šarić, Natural occurrence of aflatoxins in maize harvested in Serbia during 2009–2012, *Food Control* **34** (2013) 31–34.
- [17] Pravilnik 4: Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
- [18] Pravilnik 5: Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja (Sl. glasnik RS, br. 29/14, 37/14, 39/14 i 72/14)
- [19] J. Kos, J. Lević, O. Đuragić, B. Kokić, I. Miladinović, Occurrence and estimation of aflatoxin M<sub>1</sub> exposure in milk in Serbia, *Food Control* **38** (2014) 41–46.
- [20] N. Bilandžić, Đ. Božić, M. Đokić, M. Sedak, B. Solomun Kolanović, I. Varenina, S. Tanković, Ž. Cvetnić, Seasonal effect on aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in raw and UHT milk from Croatia, *Food Control* **40** (2014) 260–264.
- [21] D. Spiric, J. Djinovic-Stojanovic, V. Jankovic, B. Velebit, T. Radicevic, S. Stefanovic, S. Jankovic, Study of aflatoxins incidence in cow feed and milk in Serbia Book of Abstracts: 6<sup>th</sup> International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, November 5–8, 2013, Prague, Czech Republic, p. 338.
- [22] P.B. Hamilton, Fallacies in our understanding of mycotoxins. *J. Food Protect.* **41** (1978) 404–408.
- [23] M. Škrinjar, A. Vengušt, S. Kocić-Tanackov, Mikotoksini u hrani-uzorkovanje, detekcija, zakonski propisi, *Tehnologija mesa* **45** (2004) 163–169.

**SUMMARY****STUDY OF AFLATOXINS INCIDENCE IN COW FEED AND MILK IN SERBIA DURING 2013**

Danka M. Spirić, Jasna M. Đinović, Vesna V. Janković, Branko M. Velebit, Tatjana M. Radičević, Srđan M. Stefanović, Saša D. Janković

*Institute of meat hygiene and technology, Kaćanskog 13, 11000 Belgrade, Serbia*

(Scientific paper)

Atypical weather and climate conditions during the spring and summer 2012 were assumed to be the main reason for the aflatoxins contamination of corn crops in Serbia. High humidity in spring, and summer temperatures above the average contributed to the increased possibility of mycotoxins occurrence in cereals in the fields. As a consequence, at the beginning of 2013 the contaminated corn used for dairy cows diet had negative impact on the safety of cow milk. The routine laboratory control data revealed an increased content of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk samples. Large number of raw milk and various feedstuff samples were collected from February to April 2013 and were analyzed for the presence of aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) and aflatoxin B<sub>1</sub> respectively. The collected samples were a part of enhanced self-control plans of the large dairy farms. Quantitative competitive and sandwich types of ELISA tests were used for the screening analysis of the feed and milk samples. Confirmation of the positive results obtained by ELISA tests was performed by UPLC-MS/MS method. Out of 281 samples of complete mixtures for dairy cows, 67 samples (24%) contained aflatoxin B<sub>1</sub> quantities higher than the MRL of 0.005 mg/kg [4]. Corn samples were also tested for the presence of aflatoxin B<sub>1</sub> revealing contamination of 22% above the MRL (0.03 mg/kg). Aflatoxin M<sub>1</sub> content in the 934 positive milk samples ranged from 0.005–1.25 µg/kg. The corresponding feed samples of sunflower meal, hay silage, corn silage and sugar beet pulp were screening negative, with the content of aflatoxin B<sub>1</sub> less than 2 µg/kg. The main sources of aflatoxins were corn samples, wholemeal and feed mixtures derived from contaminated corn. The contamination peak was during March 2013, when 65% of milk samples contained amounts of aflatoxin M<sub>1</sub> higher than 0.05 µg/kg, and 13% of milk samples contained amounts higher than 0.5 µg/kg.

**Keywords:** Aflatoxins • Feed • Milk • ELISA • UPLC-MS/MS