

# STUDIUM OBSAHU AFLATOXINU M1 VE VZORCÍCH MLÉKA Z DISTRIBUČNÍ SÍTĚ ČR V LETECH 2004-2005

H. Moravcová, J. Nedělník

## Souhrn

V letech 2004 a 2005 byl analyzován obsah aflatoxinu M1 v mléce a mléčných produktech získaných z běžné distribuční sítě různých regionů ČR. Analyzovány byly vzorky mléka s různým obsahem tuku, různou délkou trvanlivosti i různým způsobem výroby (mléko vyrobené v ekologickém režimu). Celkem bylo do studie zařazeno 90 vzorků. Obsah toxinu byl detekován ELISA metodou. Pouze ve třech analyzovaných vzorcích byla koncentrace aflatoxinu M1 vyšší než kvantifikační limit (5 ng/kg = 5 ppt) použité metody. Nejvyšší koncentrace byla v jednom vzorku odtučněného mléka na úrovni 7,75 ppt. V žádném z testovaných vzorků nebyla detekována legislativně zakotvená nadlimitní koncentrace toxinu (0,05ug/kg).

## Abstract

Concentration of aflatoxin M1 in milk and dairy products samples from market distribution in Czech Republic was analysed. 90 samples with different quality (fat content, durability, type of production) were collected. ELISA method was used. The limit of quantification was not exceeded in 97% samples, in three samples very low concentration (5,3 – 7,75 ppt) was detected. At the moment the contamination of milk with AFM1 does not appear to be a risk to public health, in any sample was not over limit concentration detected.

aflatoxin M1, mléko, detekce, ELISA

Abbreviation: aflatoxin M1 – AFM1, aflatoxin B1 – AFB1, ng/kg - ppt

Kvalita a bezpečnost potravin je bezesporu důležitým a pro všechny zajímavým tématem, jehož význam zvláště v posledních letech rapidně narůstá. V souvislosti s ním je velmi často zmiňována problematika mykotoxinů v nejrůznějších surovinách a potravinách. Mykotoxiny jsou chemicky různorodou skupinou látek produkovanou sekundárním metabolismem některých mikroskopických hub. Z historického pohledu byly první studovanou skupinou produkty hub rodu *Aspergillus* obecně nazývané aflatoxiny. V surovinách pro výrobu potravin a krmiv se běžně vyskytují aflatoxiny typu B1 a B2, s menší četností jsou detekovány aflatoxiny typu G1 a G2. Hlavními producenty těchto kontaminantů jsou *Aspergillus flavus* a *A. parasiticus*. Výše uvedené latky bývají označovány jako aflatoxiny základní, v produktech živočišného původu (především v mléce a mléčných výrobcích) bývají zachyceny aflatoxiny typu M – aflatoxiny odvozené vznikající konverzí aflatoxinů základních.

S konzumací potravin kontaminovaných vysokými koncentracemi aflatoxinů je spojena celá řada chronických, příp. akutních onemocnění lidí. Akutní aflatoxikóza není příliš častá. Pravděpodobně první sporadické případy byly popsány v roce 1967 u dětí na Taiwanu. Děti zemřely na jaterní selhání a zdrojem toxinů byla rýže. Hromadný výskyt akutní aflatoxické hepatitidy byl popsán v Keni (MALÍŘ et al. 2003). Dalšími onemocněními vyvolanými aflatoxiny jsou primární jaterní karcinom, chronická gastritida, různá respirační onemocnění, známy jsou případy mentální retardace dětí.

Na možnost karcinogenního rizika aflatoxinu B1 upozornily rozsáhlé epidemiologické studie Afriky a Asie v oblastech s vysokou incidencí primárního karcinomu jater. Tyto studie prokázaly přímou závislost mezi tímto tumorem a stupněm kontaminace potravin. Dle klasifikace IARC je proto aflatoxin B1 zařazen do skupiny karcinogenních látek.

Aflatoxin M1 byl nalezen v kravském mléce v roce 1960, jeho strukturální vzorec byl objasněn ale až v roce 1966. Stejně jako ostatní aflatoxiny je i AFM1 polycyklický, nesaturovaný kumarin. Je 4-hydroxyderivátem AFB1. Byl nalezen v játrech, ledvinách, krvi, žluči moči a mléce savců. Vzniká hydroxylací AFB1 a ve srovnání s tímto toxinem je méně toxický a karcinogenní. AFM1 je vázán na proteinovou složku mléka, proto v sýrech je většinou zaznamenáván vyšší obsah než v mléce. K expozici člověka dochází pitím mléka a konzumací mléčných výrobků. Významné mohou být expozice u dětí s vysokou spotřebou mléka, které mají relativně nízkou tělesnou hmotnost, výrazně vyšší buněčnou aktivitu a zatím nedostatečně vyvinutý imunitní systém. Experimentálně byl prokázán poměr mezi konzumovaným množstvím AFB1 a AFM1 v mléce na úrovni 0,3-6%. I když toxicita AFM1 je nižší než AFB1 a také není zatím prokázána karcinogenita, zařadila Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny tento toxin mezi potenciální lidské karcinogeny (IARC 1993).

O závažnosti aflatoxinů jako důležitých kontaminantů svědčí mimo jiné fakt, že ve stále větším počtu zemí jsou tyto látky legislativně regulovány. AFM1 byl v roce 2003 regulován v 60 zemích, ve většině z nich je limit pro obsah tohoto mykotoxinu v mléce a mléčných výrobcích 0,05 µg/kg. EU stanovuje limit AFM1 v direktivě č. 466/2001, v české legislativě je hygienický limit pro AFM1 stanoven ve vyhlášce 305/2004 Sb. na úrovni 0,05 µg/ kg.

Mykologická a mykotoxikologická laboratoř Výzkumného ústavu pícninářského, spol. s r. o. Troubsko studovala v rámci řešení projektu QD1056 podporovaného Ministerstvem zemědělství výskyt AFM1 v mléce a vybraných mléčných výrobcích.

## **MATERIÁL A METODY**

V průběhu let 2004 a 2005 bylo shromážděno 90 vzorků mléka a smetany. Vzorky byly v několika termínech nakoupeny z běžné obchodní sítě z různých regionů ČR. Do studie byly zahrnuty všechny dostupné typy mléka a smetany (různé úrovně tučnosti, trvanlivosti, výrobní technologie) včetně výrobků z ekologického zemědělství.

Mykologická a mykotoxikologická laboratoř Výzkumného ústavu pícninářského, spol. s r. o. Troubsko má pověření SUJB pro práci s mykotoxiny. Pro analýzy byla použita metoda ELISA, obsah aflatoxinu M1 byl stanovován soupřavami s nejvyšší citlivostí. Kvantifikační limit (LOQ) byl 5 ng/kg (ppt). Pro vyhodnocení výsledků byl používán reader Biotek ELx808 a speciální software dle doporučení výrobce ELISA soupřav.

## **VÝSLEDKY A DISKUSE**

Pouze ve třech z analyzovaných vzorků byla koncentrace aflatoxinu M1 větší než LOQ – odtučněné (7,75 ppt), polotučné (5,5ppt) a odstředěné (5,3ppt). Koncentrace AFM1 v dalších 78 vzorcích byla hodnocena jako nižší než LOQ. LOQ je kvantifikační limit použité metody a znamená nejnižší koncentraci, kterou lze vyjádřit číselně. Ve zbývajícím počtu 9 vzorků nebyl AFM1 detekován. V žádném z testovaných vzorků nebyly detekovány koncentrace překračující platný hygienický limit. Jak je diskutováno níže, výsledky indikují skutečnost, že kontaminace mléka aflatoxinem M1 z distribuční sítě České republiky nepředstavuje vážné riziko pro zdraví konzumentů.

Zjištěné výsledky lze konfrontovat s publikovanými výsledky. Údajů o AFM1 kontaminaci je v literatuře velmi mnoho především v souvislosti s výskytem v potravinách mléčného původu. Rozsáhlé přehledy publikoval např. Galvano et al. (1996) či van Edmond (1989). V posledním desetiletí je zaznamenáván nižší výskyt AFM1 především v souvislosti s preciznějšími detekčními metodami, ale hlavně s přísnější regulací jeho výskytu (země EU). V evropských zemích se proto v současnosti uvádí, že kontaminace AFM1 není u výrobků

z tuzemských zdrojů vážným zdravotním rizikem, o čemž svědčí experimentální údaje z mnoha zemí (GALVANO et al. 1998; GARRIDO et al. 2003; ROUSSI et al. 2002). Výskyt AFM1 byl studován v Itálii na souboru 98 vzorků sýrů vyrobených z kravského mléka. Autoři uvádí pozitivní záchyt u 29,6% vzorků v koncentracích pohybujících se v rozmezí 50-250 ppt, tedy většinou pod hygienickým limitem. Autoři v závěrech konstatují mikrokontaminaci sýrů AFM1 a v té souvislosti nízkou expozici konzumentů (MINERVINI et al. 2001). Němečtí autoři zjišťovali výskyt AFB1 v krmivech a AFM1 v kravském mléce ve vzorcích získaných v oblasti Šlesvicko-Holštýnska. V souboru 3618 vzorků mléka byl analyzován záchyt AFM1 v rozsahu 3 ppt - 21 ppt, z toho 95% bylo nad detekčním limitem (3 ppt). Median a průměrná hodnota kontaminace ze všech vzorků byla 3,8 ppt, u vzorků determinovaných číselnou hodnotou (118 vzorů) byl medián 6,1 ppt (BLUTHGEN, UBBEN 2000). V roce 1999 shromáždili portugalská autoři 31 vzorků mléka od farmářů a 70 vzorků UHT mléka z obchodní sítě Lisabonu a analyzovali obsah AFM1. Toxin byl zachycen v 83,2% vzorků, z toho v 80,6% vzorků syrového mléka a 84,2% vzorků UHT mléka, ale pouze u dvou vzorků bylo množství AFM1 vyšší než 0,059 µg/kg. Autoři opět konstatují, že i přes vysoké procento pozitivních vzorků detekované hladiny nepředstavují riziko pro zdraví lidí (MARTINS, MARTINS 2000). Rozsáhlá studie o výskytu AFM1 byla v průběhu let 1976-1991 realizována ve Francii. Celkem bylo analyzováno několik tisíc vzorků kravského mléka. Vyjma období let 1978-1984, kdy byly detekovány relativně vyšší hladiny, nebyly zachyceny nadlimitní koncentrace AFM1 (DRAGACCI, FREMY 1993).

Pokud jsou vyrobeny mléčné produkty z mléka kontaminovaného AFM1, přechází toxin do těchto produktů. AFM1 je stabilní v syrovém mléce a obecně ani proces pasterizace nebo proces výroby sýra či jogurtů jeho stabilitu nezmění (WOOD 1991). Distribuci a stabilitu AFM1 studovali autoři v Řecku. V sýrech vyrobených z uměle kontaminovaného mléka AFM1 v koncentracích od 0,05 do 0,1 µg/l byly chromatograficky zaznamenány 3,9-4,4 krát vyšší záchyty tohoto toxinu. Autoři upozorňují na skutečnost, že pokud by byly vyráběny sýry z mléka kontaminovaného na této úrovni, budou vyrobené sýry téměř na hranici akceptovatelného množství AFM1 (250 ppt) (GOVARIS et al. 2001). Obdobnou studii realizovali Lopez et al. (2001).

Stálou pozornost je třeba věnovat analytice tohoto toxinu. Pro analýzu aflatoxinů se používají především chromatografické nebo imunoenzymatické metody. V několika pracích jsou tyto dvě metody srovnávány. Rozsáhlý přehled o chromatografických metodách uvádí Jaimez et al. (2000). ELISA metodu pro rychlý screening AFM1 v mléce doporučují italská autoři, kteří také uvádí vysokou korelaci mezi výsledky dosaženými touto metodou a metodou HPLC (ANTOLINI et al. 2000). Vysokou korelaci mezi oběma metodami na úrovni  $r = 0,9783$  publikovali Kim et al. (2000). Také výsledky dosažené autory tohoto příspěvku s vysokou korelací ( $r = 0,998$ ) s nastavenými parametry (škála standardů s definovanou koncentrací AFM1) svědčí o využitelnosti ELISA metod pro rychlé a spolehlivé stanovení obsahu AFM1 v mléčných výrobcích.

## LITERATURA

- ANTOLINI, F., NERI, A., FLORIDI, A., FLORIDI, A., FRANCIOSINI, S. (2000): Aflatoxin M1 in milk: development of analytical and sampling strategy for the duality control in the dairy factories. *Industrie Alimentari* 39: 685-690.
- BLUTHGEN, A., UBBEN, E.H. (2000): Survey of the contamination of feeds and tanker bulk milk with the aflatoxins B1 and M1 in Schleswig-Holstein. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 52: 335-354.
- DRAGACCI, S., FREMY, J.M. (1993): Occurrence of aflatoxin M1 in milk 15 years of sanitary control. *Science des Aliments* 13: 711-722.

- GALVANO, F., GALOFARO, V., GALVANO, G. (1996): Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products. A worldwide review. *J. Food Prot.*, 59: 1079-1090.
- GALVANO, F., GALOFARO, V., DE ANGELIS, A., GALVANO, M., BOGNANNO, M., GALVANO, G. (1998): Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Italy. *J. Food Prot.* 61: 738-741.
- GARRIDO, N.S., IHA, M.H., SANTOS ORTOLAMI, M.R., DUARTE FAVARO, R.M. (2003): Occurrence of aflatoxins M1 and M2 in milk commercialised in Ribeirao Preto Brasil. *Food Addit. Cotam.* 20: 70-73.
- GOVARIS, A., ROUSSI, V., KOIDIS, P.A., BOTSOGLOU, N.A. (2001): Distribution and stability of aflatoxin M1 during processing, ripening and storage of Telemes cheese. *Food Addit. Contamin.* 18: 437-443.
- IARC (1993): IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to human. IARC Press, Lyons, 445-466.
- JAIMEZ, J., FENTE, C.A., VAZQUEZ, B.I., FRANCO, C.M., CELERA, A., MAHUZIER, G., PROGNON, P. (2000): Application of the essay of aflatoxins by liquid-chromatography with fluorescence detection in food analysis. *J. Chromatography* 882: 1-10.
- KIM, E.K., SHON, D.H., RYU, D., PARK, J.W., HWANG, H.J., KIM, Y.B. (2000): Occurrence of aflatoxin M1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. *Food Addit. Contam.* 17: 59-64.
- MARTINS, M.L., MARTINS, H.M. (2000): Aflatoxin M1 in raw and ultra high temperature-treated milk commercialized in Portugal. *Food Addit. Contam.* 17: 871-874.
- MINERVINI, F., VISCONTI, A., BOTTALICO, A., MONTANA, M.T. (2001): On the occurrence of aflatoxin M1 in cheeses in some southern Italian areas. *Industrie Alimentari*, 40: 513-516.
- POLEZ, C., RAMOS, L., RAMADAN, S., BULACIO, L., PEREZ, J. (2001): Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. *Internat. J. Food Mikrobiology* 64: 211-215.
- ROUSSI, V., GVARIS, A., VARAGOULI, A., BOTSOGLOU, N.A. (2002): Occurrence of aflatoxin M1 in raw and market milk commercialised in Greece. *Food Addit. Contam.* 19: 863-868.
- VAN EDMOND, H.P. (1989): Aflatoxin M1: occurrence, toxicity, regulation. In: *Mycotoxins in dairy products*. Elsevier Applied Science, London and New York, pp. 11-55.
- WOOD, G.A. (1991): Aflatoxin M1. In: *Mycotoxins and Phytoalexins*. Boca Raton, Florida, CRC Press, pp. 145-164.

### **Poděkování**

Za technickou spolupráci autoři děkují paní Tamaře Novotné.

Publikované výsledky byly získány při řešení výzkumného projektu QD1056 „Determinace kvalitativních i kvantitativních ztrát u siláží se zaměřením na kontaminaci houbovými mikroorganismy a jejich metabolity“ podporovaného MZe ČR.

### **Adresa autorů:**

Ing. Hana Moravcová, RNDr. Jan Nedělník, PhD.  
Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r.o. Troubsko  
Zahradní 1, 664 4 1 Troubsko  
moravcova@vupt.cz