

UNIVERSITETI I PRISHTINËS  
“HASAN PRISHTINA”  
FAKULTETI I BUJQËSISË DHE VETERINARISË



Jeton Spahiu

**VLERËSIMI I PREZENCËS SË NIVELIT TË  
OKRATOKSINËS A NË LLOJET E MIELLRAVE PËR  
KONSUM HUMAN NË RAJONIN E PRISHTINËS**

PUNIMI I DOKTORATËS

Prishtinë, 2019

UNIVERSITY OF PRISHTINA  
“HASAN PRISHTINA”  
FACULTY OF AGRICULTURE AND VETERINARY



Jeton Spahiu

**EVALUATION OF THE PRESENCE OF OCHRATOXIN A  
IN DIFFERENT KIND OF FLOURS FOR HUMAN  
CONSUMPTION IN PRISHTINA REGION**

DOCTORAL THESIS

Prishtina, 2019

UNIVERSITETI I PRISHTINËS  
“HASAN PRISHTINA”  
FAKULTETI I BUJQËSISË DHE VETERINARISË

DMV. Jeton Spahiu

**VLERËSIMI I PREZENCËS SË NIVELIT TË  
OKRATOKISNËS A NË LLOJET E MIELLRAVE PËR  
KONSUM HUMAN NË RAJONIN E PRISHTINËS**

PUNIMI I DOKTORATËS

Mentori: Prof .Dr. Kurtesh Sherifi

Bashkëmentori: Prof. Dr.Dr. Manfred Gareis

Prishtinë, 2019

## PËRMBLEDHJE

Okratoksina A (OTA) është një mykotoksinë natyrore me rëndësi, e prodhuar nga myqet, e pranishme në një numër të madh produktesh bujqësore dhe ushqime në mbarë botën. Ajo prodhohet nga specie të caktuara të gjinisë *Aspergillus*, të tilla si *A. ochraceus*, ose *A. niger*, dhe disa specie të gjinisë *Penicillium*, veçanërisht *P. verrucosum*. Speciet okratoksigjenike konsiderohen si myqe “magazine”, për arsye se ato izolohen në frekuencë të shtuar gjatë kohës së magazinimit të drithëravepo miellrave, nëse ekzistojnë kushte të përshtatshme të rritjes.

OTA është një kontaminant ushqimi mjaft i përhapur dhe në mënyrë frekvente është identifikuar në të gjitha llojet e drithërave dhe produkte brumi, në kafe, kakao, rrush të thatë, sojë, biber, arvore, erëzadhe në produkte fermentimi, si në birrë apo verë. Së bashku me mykotoksina të tjera “të rëndësishme”, si aflatoksinat dhe toksinat e fusariumit, edhe OTA është e kontrolluar me legjislacion për nivelet e saj në produkte ushqimore të ndryshme në nivel shtetëror dhe ndërkombëtar, të destinuar për konsum human si edhe në bazën ushqimore për bagëti (kafshë), shpendë dhe akuakulturë.

Sëmundje të ndryshme asociohen me ekspozimin ndaj OTA-s në kafshë të mbarështuara. Një ndikim negativ dhe rëndësi në aspektin ekonomik përbën ekspozimi ndaj mykotoksinës OTA në derra ku mund të përmendet nefropatia mykotoksike e derrit, dhetek shpendët, në të cilat përmendet okratoksikoza e shpendëve.

OTA është identifikuar që në vitet 1970 si një shkaktar i nefropative humane, duke përfshirë Nefropatinë Endemike Ballkanike (BEN) dhe Nefropatinë Intersticiuale Kronike (NIK). Gjithashtu, bazuar në kancerogjencitetin e demonstruar në studimet me kafshë, Shoqata Ndërkombëtare për Kërkimin mbi Kancerin (IARC) e ka klasifikuar OTA-në Grupin 2B, si një kancerogjen të mundshëm human.

Qëllimi i këtij studimi ka qenëhulumtimi i pranisë së OTA-s në nënprodukte drithi, si: miell misri, miell gruri dhe miell thekre. Drithërat dhe nënproduktet e tyre përbëjnë ushqimin bazë në dietën e përditshme ushqimore për popullatën evropiane, pra edhe në Kosovë, dhe në shkallë më të gjerë, në rang botëror. Ky hulumtim është realizuar në rajonin e Prishtinës, në të cilin përfshihen 7 komuna (Prishtina, Podujeva, Lipjani, Fushë Kosova, Obiliqi, Drenasi dhe Graçanica). Nivelet e prezencës sëOTA-s në këto artikuj ushqimore u ekstrapoluan në niveleekspozimi të popullatësduke u bazuar në metodat e propozuara nga agjencitë

ndërkombëtare të Sigurisë Ushqimore, si Agjencia Europiane për Siguri Ushqimore (EFSA) dhe Komiteti i Përbashkët i Ekspertëve për Shtesat Ushqimore (JECFA) për vlerësimin e rrezikut të popullatës në kuadër të sigurisë ushqimore. Mostrat e analizuar u mbledhën përgjatë viteve 2016-2017, me numër total prej 440, nga të cilat 310 mostra miell gruri me origjinë vendi dhe importi; 90 mostra miell misri me origjinë vendi dhe importidhe 40 mostra miell thekre me origjinë vendi, një shpërndarje e tillë - sipas llojit - përkon me shkallën e konsumit për secilin lloj drithi të përfshirë në studim.

Puna hulumtuese është bazuar në përcaktimin e Okratoksinës A me metodën imunoenzimatike orientuese ELISA. Në vijim, mostrat vendore të kontaminuara me OTA u testuan me metodën konfirmuese me Kromatografi të Lëngët, të çiftuar me dy spektra mase (LC-MS/MS), ndërsa mostrat e importit për konfirmim u testuan me metodën UHPLC-MS/MS, në Laboratorin Referent për mykotoksina (EURL), të njohur nga autoritetet e Komisionit Evropian. Të njëjtat mostra u testuan edhe me metodën “screening” me Kromatografi të Shtresës së Hollë me Performancë të Lartë (HPTLC).

Bazuar në të dhënat e përftuara me metodën ELISA, për dy vitet në studim u konstatuan 59 mostra (13.4%) të kontaminuara me OTA, ndërsa pjesa tjetër prej 381 mostrash (86.6%) rezultuan nën nivelin e detektimit. Nëse këto vlera analizohen sipas viteve përkatëse, në vitin 2016 mostrat e analizuar treguan një nivel kontaminimi prej 15.08% (35/232) me OTA, kurse për vitin 2017 rezultuan 12.01% (24/208) mostra. Vlera maksimale e OTA-s për mostrat e vendit u konstatua në një mostër miell gruri 2,702 µg/kg, kurse në mostrat me origjinë importi ajo përkoji në një mostër miell misri (2,726 µg/kg). Bazuar në legjislacionin shtetëror dhe atë ndërkombëtar, që rregullojnë sigurinë ushqimore për kufijtë maksimalë të lejuar për praninë e OTA-s në nënprodukte drithi, rezultoi se asnjë mostër e identifikuar me prani të OTA-s nuk e tejkaloi vlerën prej 3 µg/kg.

Në bazë të rezultateve të fituara me metodën ELISA, për të gjitha mostrat me origjinë vendi dhe importi u realizua edhe vlerësimi i rrezikut të ekspozimit ndaj OTA-s nëpërmjet dietës ushqimore të popullatës në rajonin e Prishtinës. Në dy vitet e përfshirë hulumtim, përvetësimi ditor i OTA-s nëpërmjet konsumit të nënprodukteve të drithit, të analizuar për mostramiell misri, ishte respektivisht 0.36 dhe 0.11 nanogram për kilogram peshë trupore në një ditë (ng/kg pt/ditë), kurse përvetësimi ditor i OTA-s përmes mostrave miell gruri ishte 0.36 dhe 0.26 ng/kg pt/ditë. Autoriteti i Sigurisë Ushqimore në Evropë (EFSA) ka nxjerrë rekomandime për nivelet

maksimale të lejuar për përvetësim të mykotoksinës OTA në një ditë, në bazë të peshës trupore të një individi, prej 17 ng/kg pt/ditë, nivel i cili është shumëfish më i lartë krahasuar me gjetjet e hulumtimit tonë. Edhe pse vlerat e përfuara janë të kufizuara vetëm për nënprodukte drithi, ne besojmë se për nivelin e lartë të konsumit që zë drithi në dietën e popullatës, një vlerë e përgjithshme ekspozimi e individëve ndaj OTA-s sërish do të ishte nën vlerën e referuar nga EFSA.

Si përfundim, OTA, si kontaminues i produkteve ushqimore me bazë drithi, në këto nivele të gjetur në këtë studim, nuk përbën rrezik për shëndetin e konsumatorëve në zonat e hulumtimit në vendin tonë. Megjithatë, nga autoritetet përgjegjëse të sigurisë ushqimore në vend kërkohet të realizojnë monitorimin e kësaj mykotoksine në vazhdimësi dhe sugjerojmë që të zgjerohet edhe gama e produkteve ushqimore në analizë. Kështu, do të kishim një pasqyrë më të qartë të sigurisë ushqimore sa i përket pranisë së mykotoksinës OTA në dietën e konsumatorit në vendin tonë.

**Fjalë kyçe:** Okratoksina A, nënprodukte drithi, miell, rajoni i Prishtinës, ELISA, LC MS/MS, UHPLC MS/MS, HPTLC, vlerësim ekspozimi, përvetësim ditor.

## SUMMARY

Ochratoxin A (OTA) is an important natural mycotoxin produced by fungi, present in a large number of agricultural products worldwide. It is produced by certain species of *Aspergillus* genus, such as *A. ochraceus*, or *A. niger*, and some *Penicillium* species, especially *P. verrucosum*. Ochratoxigenic species are considered as "storage" molds because they are isolated at increased frequency during the storage of grain or flours if they exist in inappropriate conditions.

OTA is a widely known food contaminant and has been frequently detected in all types of cereals and dough products; in coffee, cocoa, raisins, soybean, pepper, spices, and fermentation products, like beer or wine. Together with other "relevant" mycotoxins such as aflatoxins and *Fusarium* toxins, OTA is also controlled by legislation on its levels in various food products at the state and international level with the destination of human and animal intake.

Various illnesses are associated with exposure to OTA in the feedstock. Importance to surveillance of OTA is connected to the negative impact especially in pigs' economy, referred to as mycotoxic nephropathy, as well as in the poultry, referred to as birds' ochratoxicosis. But, OTA has been referred too, as a cause of human nephropathy including the Endemic Balkan Nephropathy (BEN) and the Interstitial Chronic Nephropathy (NIK). The International Association for Cancer Research has classified OTA as a potential human carcinogen (Group 2B).

This study aimed to investigate OTA's presence in cereal by-products, such as corn flour, wheat flour, and rye flour. The present level of OTA presence at the exposure level of the population was based on the methods proposed by the International Food Safety Agency, such as EFSA and JECFA. Their cereals and their by-products constitute the basic food in the daily diet of the European population, even in Kosovo, and the world's largest scale.

This research was conducted in the Pristina Region, which includes 7 municipalities (Prishtina, Podujeva, Lipjan, Fushe Kosova, Obiliq, Drenas, and Graçanica). Samples were collected over 2016-2017, a total number resulted in 440, of which 310 samples of wheat flour originating in the country and import, 90 shows cornflour with country origin and import, and 40

rye flour samples of country origin, such a spread by type is related to the consumption rate for each type of grain included in the study.

This research was based on the determination of ochratoxin A with the ELISA immunoenzyme-linked method. Subsequently, OTA-contaminated domestic samples were tested by a two-mass spectrum (LC-MS/MS) liquid chromatography confirmatory method, while the confirmation import samples were tested by the UHPLC-MS/MS in the Laboratory Mycotoxin Reference (EURL) recognized by the European Commission authority. The same samples were also tested by the High-Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC).

The results obtained by ELISA for the two years indicated 59 samples (13.4%) were contaminated with OTA, while the rest were below the detection level. According to respective years, in 2016 the analyzed samples showed a contamination level of 15.08% (35/232), while in 2017, the incidence of positive samples was 12.01% (24/208). The maximum OTA value (2.702  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) to the samples group of domestic origin was found in wheat flour, whereas in the samples group of import origin it amounted to cornflour (2.726  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Based on national and international legislation regulating food safety, the maximum permitted limits for the presence of OTA in cereal by-products results that no sample identified with the presence of OTA does not exceed the ML value (3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Based on the results obtained with the ELISA method for all samples originating from the country and import, the OTA exposure risk assessment was carried out through the food diet of the population in the Prishtina region. In the two years included in our period research, OTA daily absorption through the consumption of cereal by-products analyzed for corn flour samples was respectively 0.36 and 0.11 ng/kg bw/day, while the daily absorption of OTA through wheat flour sampling was 0.36 and 0.26 ng/kg bw/day. The European Food Safety Authority (EFSA) has issued legal provisions for the maximum permissible levels for OTA on one day based on the bodyweight to any individual, of 17 ng/kg bw/day, which results from multiple higher compared to our found values. Although the values are limited in terms of crop yield, we believe that for the high level of consumption of grain in the population, a general exposure of individuals to the OTA swarm would have been estimated by EFSA.

In conclusion, OTA as a contaminant of grain-based food products at these levels found in this study does not pose a risk to the health of consumers in research areas in our country. However, it is required by the responsible food safety authorities instead to carry out monitoring



of this mycotoxin in follow-up and suggest that the range of food products in the analysis also be expanded. So we will have a clearer picture of food safety regarding the presence of OTA mycotoxin in the diet of the consumer in our country.

**Keywords:** Ochratoxin A, cereal by-products, flour, Prishtina region, ELISA, LC-MS/MS, UHPLC, HPTLC, Exposure Assessment, Daily Intake.