

UNIVERSITETI I PRISHTINËS
FAKULTETI I BUJQËSISË DHE VETERINARISË

Arieta Camaj Ibrahim

**PËRCAKTIMI I AFLATOKSINËS M1 NË
QUMËSHT TË PAPËRPUNUAR NË REGJION
TË KOSOVËS**

PUNIMI I DOKTORATËS

Prishtinë, 2018

UNIVERSITY OF PRISHTINA
FACULTY OF AGRICULTURE AND VETERINARY

Arieta Camaj Ibrahim

**AFLATOXIN M1 OCCURRENCE IN RAW
MILK IN KOSOVA REGION**

DOCTORAL THESIS

Prishtinë, 2018

REZYME

Aflatoksinet janë mykotoksine të prodhuara nga disa kërpudha të gjinisë *Aspergillus*, kryesisht *A. flavus* dhe *A. parasiticus*. Aflatoksinet në ushqim të kafshëve mund të jenë në disa forma, por kryesisht si aflatoksine B₁, B₂, G₁, dhe G₂. Aflatoksina B₁ (AFB₁), është metabolit toksik, që kontaminon ushqimin e kafshëve dhe është e njohur si hepatokarcinogjen potencial për shumë lloje të gjitarëve, përfshirë edhe njeriun. Gjedhetë që konsumojnë ushqim të kontaminuar me AFB₁, sekretojnë aflatoksinen M₁ (AFM₁) në qumësht. AFM₁ është metabolit i hidroksiluar i AFB₁, e cila paraqitet në qumësht të bagëtive qumështore ripërtpëse kur ushqimi është i kontaminuar me AFB₁. Edhe pse AFM₁ është më pak toksike se AFB₁, sipas Agjencionit Internacional për Hulumtime të Kancerit (IARC 2002) klasifikohet në grupin 1B të substancave karcinogjene Rregullorja e Komisionit të Bashkimit Evropian (EC) 1881/2006 ka përcaktuar limitin maksimal (0.05 ng/mL) për AFM₁ në qumësht të papërpunuar, qumësht të trajtuar me nxehtësi dhe në qumësht që përdoret për prodhimetë qumështit. Rregullorja e njëjtë përcakton limitin më të ultë, 0.025 ng/mL, për qumësht të foshnjëve dhe fëmijëve të vegjël, poashtu edhe për ushqim dietal për qëllime specifike të dedikuara në mënyrë të veçantë për fëmijë. Ligjet respektive të Kosovës janë të harmonizuara me legjislacionin e Unionit Evropian.

Në këtë hulumtim janë mbledhur mostrat e qumështit të papërpunuar të gjedhit gjatë muajve shkurt/mars dhe korrik/gusht të vitit 2016 (në stinët dimër dhe verë), .Mostrat janë grumbulluar nga 192 vendmostrime në ferma të vogla duke përfshirë pesë regjione të mëdha të Kosovës (Prishtinë, Prizren, Pejë, Mitrovicë, dhe Gjilan). Të gjitha mostrat e mbledhura janë analizuar për përcaktimin e nivelit të kontaminimit me AFM₁. Niveli i kontaminimit me AFM₁ është vlerësuar duke përdorur dy metoda: (1) metoda ekzaminuese “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) dhe (2) metoda konfirmative “Ultra High Performace Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry” (UHPLC-MS/MS). Nga 192 vendmostrime të hulumtuara, bazuar në të dy metodat e përdorura për analizë, 80 mostra (41,7%) rezultuan të jenë pozitive në AFM₁. Prej tyre, 43 mostra (53.8%) janë të stinës së dimrit dhe 37 mostra (46.2%) të stinës së verës. Shumica e mostrave pozitive ishin nga regjioni i Prizrenit, 32 mostra (53% nga totali i mostrave të këtij regjioni), në vazhdim pason regjioni i Pejës me 25 mostra (50% e totalit të mostrave të këtij regjioni), ndërsa regjioni me numrin më të vogël të mostrave pozitive ishte

Mitrovica me 7 mostra, apo 23%. Numri i mostrave që tejkalon kufirin maksimal të lejuar sipas Unionit Evropian, është 12 (6.25%), prej të cilave më së shumti mostra janë gjetur në regjionin e Prizrenit (4 mostra 33.3%), kurse në regjionin e Mitrovicës nuk është gjetur asnjë mostër që tejkalon kufirin maksimal të lejuar. Niveli i kontaminimit gjatë stinës së dimrit është 0.004 – 0.084 ng/mL, ndërsa gjatë stinës së verës është 0.004 – 0.100 ng/mL. Diferenca statistikore për nivelin e AFM₁ është signifikante (në nivelin prej P < 0.05 deri në P < 0.0001). Gjatë këtij hulumtimi niveli më i lartë i kontaminimit është gjetur në mostrat e stinës së dimrit, përveç në regjionet e Gjilanit dhe të Prishtinës, ku kontaminimi më i lartë është regjistruar në stinën e verës. Pas krahasimit të rezultateve të fituara me dy metodat e përdorura për analizë, ELISA dhe UHPLC-MS/MS, konstatojmë se afër 2/5 e rezultateve të fituara me metodën konfirmative UHPLC-MS/MS dallojnë nga rezultatet e fituara me metodën ELISA. Sipas këtij treguesi shtrohet nevoja e përdorimit të një metode tjetër konfirmative gjatë hulumtimit. Në këtë kontekst përdorimi i kolonave kromatografike imunoafinitive (IAC), për ekstraktim të AFM₁ nga qumështi, rezultuan të jenë shumë më efikase se metodat klasike. Poashtu, në këtë studim u konstatua që kolonat kromatografike imunoafinitive kanë efikasitet të lartë edhe deri në tri përdorime të mundshme.

Rezultatet eksperimentale nga ky hulumtim tregojnë se kontaminimi i qumështit të papërpunuar të gjedhit me AFM₁ në Kosovë, në raste të caktuara i tejkalon dozat e kufijve maksimal të lejuar sipas standardeve vendore dhe ndërkombtare dhe kështu mund të paraqes rrezik për shëndetin publik.

Fjalët kyçe

Aflatoksina M₁, ELISA, Kosovë, qumështi i papërpunuar, UHPLC-MS/MS

RESUME

Aflatoxins are mycotoxins produced by several fungi of the genus *Aspergillus*, particularly *A. flavus*, *A. parasiticus*. Aflatoxins can be present in several forms in animal feed, but most commonly as aflatoxin B₁, B₂, G₁, and G₂. Aflatoxin B₁ (AFB₁) is a toxic metabolite that contaminates animal feed and is known as a potent hepatocarcinogen in a variety of mammals, including humans. Cows that consume AFB₁ contaminated feed excrete aflatoxin M₁ (AFM₁) in their milk. AFM₁ is the hydroxylated metabolite of AFB₁, which occurs in milk of ruminant dairy livestock if the feed is contaminated with AFB₁. Although AFM₁ is slightly less toxic than AFB₁, it is still classified as a Group 1B carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (IARC 2002). The European Union Commission Regulation (EC) 1831/2003 has set maximum tolerable limit (0.05 ng/mL) for AFM₁ in raw milk, heat-treated milk and milk for the manufacture of milk-based products. The same regulation sets lower maximum level of 0.025 ng/mL for infant formulae and follow-on formulae, including infant milk and follow-on milk, as well as for dietary food for special medical purposes intended specifically for infants (European Commission 2006b). The respective Kosovo laws are harmonized with the European Union Legislation. During this study, the raw cow's milk samples were collected during February/March and July/August 2016 (winter and summer season). The samples have been collected from 192 sampling points from small milking farms, including five different major regions of Kosova (Prishtina, Prizren, Peja, Mitrovica, and Gjilan). All of the samples collected have been analyzed to determine the contamination level of AFM₁. The contamination level of AFM₁ was determined using two methods: (1) the screening method "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA), and (2) the confirmative method "Ultra High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry" (UHPLC-MS/MS). From 192 sampling points surveyed, according to the two methods used for the determination, 80 samples (41,7%) resulted to be positive. Out of them, 43 samples (53.8%) were of the winter season, and 37 samples (46.2%) of the summer season. Most of the positive samples were from the region of Prizren, 32 samples (53% of the total samples of this region), next was the region of Peja with 25 samples, (50% of the total samples of this region), whereas, the least in the region of Mitrovica with 7 positive samples (or 23%). There were 12 samples (6.25%) that exceeded the

maximum tolerable limit set by European Union, from which most of the samples (4 samples or 33.3%) were from the region of Prizren, whereas in the region of Mitrovica there was not any sample that exceeded the maximum tolerable limit. Contamination level during the winter season was from 0.004 – 0.084 ng/mL, while during the summer season was from 0.004 – 0.100 ng/mL. The statistical difference of AFM₁ level between the seasons was significant (from P < 0.05 to P < 0.0001). During this study, a higher level of contamination is found during the winter season, except for the regions of Gjilan and Prishtina, where was recorded a higher contamination during the summer season. When comparing the results found with the two methods used for the analysis, ELISA and UHPLC-MS/MS, it can be noted that, about 2/5 of the results found by the confirmative method UHPLC-MS/MS differ from the results found with the screening method ELISA. According to this, there is a need of using another confirmative method for the determination of AFM₁ in milk. In this context, the use of the immunoaffinity columns (IAC) for the extraction of AFM₁ in milk, revealed to be much more effective than the classical methods used of the extraction. Also, in this study it is found that these immunoaffinity columns have high efficacy of extraction until three possible uses.

Experimental results of this study reveal that the AFM₁ raw cow's milk contamination in Kosova, in certain cases, according to the local and international standards, exceeds the maximum tolerable limit, as a result it may pose a public health risk.

Key words

Aflatoxin M₁, ELISA, Kosova, Raw Milk, UHPLC-MS/MS