

## PREGLEDNI RAD / REVIEW

# Fuzarijski mikotoksini u hrani i hrani za životinje

## *Fusarium mycotoxins in food and feed*

Jelka Pleadin<sup>1\*</sup>, Jadranka Frece<sup>2</sup>, Višnja Vasilj<sup>3</sup>, Ksenija Markov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dr. sc. Jelka Pleadin, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, Hrvatski veterinarski institut, Savska cesta 143, 10 000 Zagreb

<sup>2</sup>Dr. sc. Jadranka Frece, dipl. ing. biotehnol., izvanredni profesor, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb

<sup>3</sup>Dr. sc. Višnja Vasilj, dipl. ing. agronom., docent, Sveučilište u Mostaru, Agronomski i Prehrambeno-tehnološki fakultet, Biskupa Čule b.b., 88 101 Mostar, Bosna i Hercegovina

<sup>2</sup>Dr. sc. Ksenija Markov, dipl. ing. biotehnol., izvanredni profesor, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb

### Sažetak

Fuzarijski mikotoksini, među kojima su najzastupljeniji zearalenon, deoksinivalenol, fumonizini i T-2 toksin, su česti onečišćivači hrane i hrane za životinje, primarno žitarica i njihovih proizvoda. Onečišćenje hrane fuzarijskim mikotoksinima može uzrokovati brojne kronične i akutne toksične učinke u ljudi i životinja. Razina onečišćenja ovisna je o brojnim čimbenicima, započinje još na polju i moguća je u svim fazama proizvodnje hrane "od polja do stola", uključujući skladištenje, te varira s obzirom na geografsko područje i klimatske uvjete. U određenoj mjeri, prisutnost manjih količina fuzarijskih mikotoksina u žitaricama i srodnim prehrambenim proizvodima je neizbježna, te je od velikog značaja za zaštitu javnog zdravlja uspostava smjernica i odredbi zakonodavstva i procjena rizika na nivou svake zemlje. U cilju sprječavanja onečišćenja te štetnih posljedica po zdravlje ljudi i životinja, kao i ekonomskih gubitaka u prehrambenoj i stočarskoj industriji, vrlo je značajna primjena prikladnih preventivnih mjera. Ukoliko ipak dođe do značajnijeg onečišćenja, potrebna je primjena učinkovitih metoda redukcije odnosno dekontaminacije, uz sustavnu kontrolu razine fuzarijskih mikotoksina i primjenu suvremenih analitičkih metoda u njihovoj detekciji.

**Ključne riječi:** zearalenon, deoksinivalenol, T-2 toksin, fumonizin, žitarice, onečišćenje hrane i hrane za životinje

### Summary

*Fusarium mycotoxins, predominately zearalenone, deoxynivalenol, fumonisins and T-2 toxin, are common contaminants of food and feed, mainly cereals and their products. Fusarium mycotoxin contamination of food can cause a number of acute and chronic toxic effects in humans and animals. The level of pollution authority-is on many factors, starting another on the field and it is possible at all stages of food production "from farm to fork", including storage, and this varies according to geographical area and climatic conditions. To some extent, the presence of small quantities of Fusarium mycotoxins in cereals and related food products is inevitable and it is of great importance for the protection of the public health establishment of guidelines and provisions of the legislation and risk assessment at the level of each country. In order to prevent pollution and negative effects on human and animal health, as well as economic losses in the food and livestock industry, appropriate preventive measures are of high significance. In case of significant pollution, there is a need for application of effective methods in their reduction and decontamination, with systematic control of levels of fusarium mycotoxins and use of modern analytical methods in their detection.*

**Keywords:** zearalenone, deoxynivalenol, T-2 toxin, fumonisin, cereals, food and feed contamination

### Uvod

Mikotoksini kao produkti toksikogenih plijesni predstavljaju vrlo česte onečišćivače hrane i hrane za životinje, uzrokujući značajne gubitke tijekom procesa njihove proizvodnje i skladištenja. Vrlo značajnu skupinu čine mikotoksini koje sintetiziraju plijesni iz roda *Fusarium*, tzv. fuzarijski mikotoksini, koji učestalo onečišćuju hranu u sjevernih i umjerenih područja Amerike, Europe i Azije (Tanaka i sur., 1988; Bottalico, 1998; Creppy, 2002; Geraldo i sur., 2006). Žitarice pritom predstavljaju najznačajniji izvor fuzarijskih mikotoksina, budući da plijesni koje produciraju ove onečišćivače rastu na njima kao patogeni ili saprofiti, za vrijeme uzgoja, ali i tijekom faze skladištenja (Schothorst i van Egmond, 2004; Glenn, 2007). Većina plijesni roda *Fusarium* sposobna je proizvoditi u različitim količinama dva ili više različitih mikotoksina (SCF, 2002). Najznačajniji fuzarijski mikotoksini u žitaricama i proizvodima na bazi žitarica su zearalenon (ku-

kuruz, pšenica), deoksinivalenol (pšenica, kukuruz, ječam, zob i raž), fumonizini (kukuruz) te T-2 toksin (zob, pšenica, ječam).

Istraživanja su pokazala da fuzarijski mikotoksini uzrokuju bolesti mikotoksikoze te da imaju genotoksično, nefrotoksično, citotoksično, estrogeno i teratogeno djelovanje. Kod životinja, učinak ovisi o vrsti, a posebno su osjetljive monogastrične životinje (svinje). Preživači su u pravilu otporniji na negativne učinke mikotoksina, budući da mikroorganizmi u buragu ima sposobnost njihove razgradnje do manje toksičnih spojeva. Toksični učinci mikotoksina imaju kao posljedicu narušavanje zdravlja ljudi i životinja, povećane troškove zdravstvene skrbi, smanjenje prinosa kod stoke, zbrinjavanje onečišćene hrane i hrane za životinje te ulaganje u brojna znanstvena istraživanja u cilju smanjenja ozbiljnosti problema vezanih uz onečišćenje ovim tvarima (Hussein i Brasel, 2001).

Konzumacija onečišćene hrane ili hranidba životinja onečišćenim krmivima i krmnim smjesama može rezultirati ugrožavanjem zdravlja ljudi odnosno životinja (IARC, 1993; Canady i sur., 2001; Sudakin, 2003; Kabak i sur., 2006). Istovre-

meno mogu djelovati na različite načine i na više ciljnih tkiva u organizmu, u ovisnosti o toksičnosti pojedinog mikotoksina te dozi i vremenu izloženosti. Utjecaj mikotoksina na zdravlje ljudi i životinja ujedno ovisi i o sinergističkim učincima sa drugim pratećim mikotoksinima, što se očituje kroz relativno niske koncentracije pojedinog mikotoksina u hrani i hrani za životinje, ali sa ozbiljnim posljedicama po zdravlje. Međutim, sinergistički učinci mikotoksina su nedovoljno ispitani te su potrebna njihova daljnja istraživanja (CAST, 2003; Erber i Binder, 2004). Ujedno su nužna daljnja ispitivanja distribucije i eliminacije fuzarijskih mikotoksina u ljudi i životinja te prisutnosti njihovih toksičnih ostataka u različitim jestivim tkivima i tekućinama (meso, iznutrice, mlijeko) (Cavret i Lecoeur, 2006).

Čimbenici koji utječu na nastanak plijesni i tvorbu fuzarijskih mikotoksina odnose se na prisutnost plijesni, razinu vlage, temperaturu, aeraciju, prisutnost insekata i mehaničkih oštećenja zrna (CAST, 2003; Sforza i sur., 2006). Njihova raširenost odnosno razina onečišćenja najčešće je ovisna o klimatskim uvjetima te varira po različitim klimatskim zonama u svijetu (Placinta i sur., 1999; Mateo i sur., 2002; Sforza i sur., 2006). Istraživanja su pokazala da je problem fuzarijskih mikotoksina posebno izražen tijekom kišovitih godina s izraženim temperaturnim promjenama (Pleadin i sur., 2012a; Pleadin i sur., 2012b), kada značajno poraste onečišćenje plijesnima, uzrokujući pojačanu tvorbu mikotoksina (Pepeljnjak i sur., 2008; Pleadin i sur., 2012c).

Višegodišnja istraživanja provedena u Hrvatskoj također govore o učestalom onečišćenju hrane (žitarica) i hrane za životinje (krmiva i krmnih smjesa) ovim mikotoksinima (Pepeljnjak i Šegvić, 2004; Domijan i sur., 2005; Perši i sur., 2011; Vulić i sur., 2011; Pleadin i sur., 2012d; Pleadin i sur., 2014a) te upućuju na nužnost sustavne kontrole i prevencije onečišćenja ili primjene dekontaminacijskih metoda, kako bi se spriječili negativni učinci na zdravlje ljudi i životinja te smanjili ekonomski gubici u prehrambenoj i stočarskoj industriji.

## Svojstva i toksični učinci fuzarijskih mikotoksina

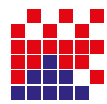
**Zearalenon.** Mikotoksin zearalenon (F-2 toksin) spada u skupinu makrocikličnih laktona. Izoliran je 1962. godine iz kulture plijesni *Giberella zaeae*, koja je spolni stadij plijesni *Fusarium graminearum* (Bennet i Klich, 2003). Zearalenon dolazi kao metabolit plijesni *Fusarium roseum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium tricinctum* i *Fusarium moniliforme*. Danas je poznato preko 150 derivata zearalenona, među kojima je najznačajniji  $\alpha$ -zearalenol, ujedno tri do četiri puta toksičniji od zearalenona, te  $\beta$  izomer čija je aktivnost približno jednaka zearalenonu. U prirodi se ovaj mikotoksin nalazi u zrnu kukuruza s visokim sadržajem vode, onečišćenim ponajprije s *Fusarium roseum* u kasnu jesen i zimu. Mehanizam djelovanja zearalenola temelji se na strukturnoj sličnosti estrogenu, s obzirom da je strukturni analog estrogena (djeluje kao  $\beta$ -estradiol). Zearalenol se veže na receptore estrogena u citoplazmi stanica spolnih organa. Nastali kompleks ulazi u staničnu jezgru gdje izaziva brojne biokemijske i biološke učinke, kao što su povećanje propusnosti stanične stijenke, poticanje sinteze RNK, DNK i proteina. Općenito aktivnost zearalenola je posredovana estrogenim receptorima u ciljnom tkivu, kao i

kod estradiola. Koncentracija zearalenona se smanjuje u jetri i ovisno o životinjskoj vrsti razlikuje se mjesto biotransformacije ovog spoja u organizmu. Zearalenon je termostabilan, nije topljiv u vodi, ugljik-disulfidu i ugljik-tetrakloridu, a topljiv je u vodenim alkalijama, eteru i alkoholu (Hagler i sur., 1979; Ožegović i Pepeljnjak, 1995).

Zearalenon i njegovi metaboliti poznati su po estrogenim i anaboličkim svojstvima. Toksični učinak zearalenona ovisi o koncentraciji, vremenu izlaganja i općem fiziološkom stanju organizma. Njegova resorpcija iz probavnog sustava je neznatna (oko 3%), a u buragu se transformira u  $\alpha$  i  $\beta$  zearalenol. Ovaj mikotoksin se može zlouporabiti kao anabolički agens u ovaca i goveda radi poboljšanja rasta i djelotvornijeg iskorištenja krmiva (Zinedine i sur., 2007). Osim blagog estrogenog učinka, inhibira stvaranje folikularno stimulirajućeg hormona (FSH), pa ne dolazi do ovulacije (esterogenski receptori u hipotalamusu i hipofizi). Ovaj spoj pokazuje afinitet prema žutom tijelu, odnosno luteotropin je, što za posljedicu ima porast koncentracije progesterona u krvi i pojavu "lažne" trudnoće. Kod muških jedinki smanjuje koncentraciju testosterona u plazmi (Hidy i sur., 1977; Zinedine, 2007). Biološki učinak u ljudi očituje se preuranjenim pubertetnim simptomima kod djece čije su majke tijekom trudnoće konzumirale hranu onečišćenu zearalenonom (Szuets i sur., 1997). U krvi djevojčica s preuranjenim spolnim sazrijevanjem u Portoriku, te kod djevojčica sa utvrđenim preuranjenim pubertetom u Mađarskoj, u krvi je pronađen zearalenon (Markov, 2005; Delaš, 2010). Studije genotoksičnog učinka zearalenona ukazuju na takav učinak kod miševa. Genotoksični učinak može ovisiti o vrsti životinja na kojima se provodi ispitivanje, a kako bi se ovaj spoj uzeo u obzir kao potencijalni mutageni odnosno kancerogeni agens kod ljudi, potrebno je provesti daljnja ispitivanja (Zinedine, 2007).

**Deoksinivalenol.** Deoksinivalenol (DON, vomitoksin) pripada tipu B trihotecenskih mikotoksina, a prvi put je izoliran 1972. godine iz oštećenog zrna ječma. Glavni producenti ovog mikotoksina su plijesni *Fusarium graminearum* i *Fusarium culmorum*, a javlja se češće kod žitarica kao što je kukuruz, pšenica i ječam, nego li kod zobi, raži i riže (Doohan i sur., 2003). Može biti prisutan i u proizvodima životinjskog podrijetla, kao što je meso i mlijeko (Cavret i Lecoeur, 2006). Optimalna temperatura rasta ovih plijesni koje produciraju DON je od 25 do 28 °C, uz aktivitet vode od 0,97. DON je bezbojan sitan prah, topljiv u polarnim otapalima, kao što su voda, metanol, etanol, acetonitril i etilacetat. Stabilan je tijekom skladištenja, mljevenja, prerade i toplinske obrade hrane.

U usporedbi s drugim trihotecenima DON se smatra jednim od manje toksičnih. U buragu preživača DON se metabolizira u DOM-1, koji je znatno manje toksičan od izvornog oblika. Kod životinja, akutna izloženost DON-u izaziva smanjen unos hrane i povraćanje, a kod kronične izloženosti uzrokuje smanjeni prirast te promjene na prsnoj žlijezdi (timusu), slezeni, srcu i jetri. Najosjetljivije životinje na ovaj mikotoksin su svinje. Razina DON u hrani za svinje od 5 mg/kg smanjuje iskorištenje hrane za 30-50%, jer svinje odbijaju ishranu takvom hranom. Način kojim svinje u hrani prepoznaju prisutnost plijesni producenta DON-a nije poznat, ali se pretpostavlja da odbijaju hranu zbog mirisa i okusa. Manje količine DON u hrani za svinje ne izazivaju odbijanje hrane, a smatra se da količina od 3,5 mg/kg hrane DON-a uzrokuje smanjenje težine tijekom graviditeta te utječe i na daljnju laktaciju. DON se brzo



i djelotvorno apsorbira i slabo metabolizira, pa se više od 95% unesenog DON-a izluči mlijekom, urinom i fecesom krava i svinja. Ostatci DON-a mogu se naći u organima svinja koje su hranidbom dobivale onečišćenu hranu (srcu, bubrezima, jetri, slezeni), ali se ne mogu detektirati ukoliko se DON ukloni iz hrane 12 sati prije klanja (Whitlow i sur., 2006). Kod ljudi uzrokuje akutnu mučninu, povraćanje, proljev, bol u trbuhu, glavobolju, vrtoglavicu i groznicu. DON je poznat kao inhibitor sinteze proteina, što za posljedicu ima povećanje koncentracije aminokiseline triptofana i sinteze serotonina. Smatra se da je povećana koncentracija serotonina uzrok smanjenom unosu hrane. DON mijenja odgovor serumskih imunoglobulina IgA, koji se nalaze u sekreciji sluznica crijeva, gdje je glavna zaštita od antigena u hrani. Dokazano je da DON u kombinaciji s drugim mikotoksinima (npr. u kombinaciji s aflatoxinom B<sub>1</sub>) ima izraženo mutageno djelovanje, dok sam u istraživanjima na eksperimentalnim životinjama nije pokazao kancerogeni učinak. Zbog nedovoljno dokaza o kancerogenosti ovog mikotoksina IARC (*International Agency for Research on Cancer*) ga je svrstala u skupinu 3 (IARC, 1993).

**Fumonizini.** Fumonizini su sekundarni metaboliti koje sintetiziraju plijesni *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* i *Fusarium moniliforme*. Otkriće ove skupine mikotoksina povezano je s istraživanjem pojave leukoencefalomalacije u konja. Po kemijskoj strukturi to su alifatski ugljikovodici s terminalnom amino skupinom i dva lanca trikarboksilnih kiselina. Ovisno o broju i smještaju hidroksilnih skupina razlikujemo fumozin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>3</sub>. Fumozin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) je najtoksičniji predstavnik ove skupine mikotoksina. FB<sub>1</sub> je diester propan-1,2,3-trikarboksilne kiseline (Duraković i Duraković, 2003). Fumonizini su jedinstvenih fizikalnih svojstava među mikotoksinima. Topljivi su u vodi, acetonitrilu i metanolu, termostabilni i otporni na lužine. Stabilni su na povišenim temperaturama tijekom procesiranja hrane i nisu fotosenzibilni (WHO, 2001). Kao najčešći izvor fumonizina su kukuruz i proizvodi na bazi kukuruza, zatim riža i ječam, a često ga se može naći i u kombinaciji s drugim mikotoksinima. Značajne količine ovog mikotoksina identificirane su i u namirnicama namijenjenim ljudskoj prehrani, a u mlijeku, mesu ili jajima životinja, hranjenih hranom onečišćenom fumonizinom FB<sub>1</sub> nije određen u koncentraciji koja bi bila štetna za ljudsko zdravlje (WHO, 2001). Vrlo malo podataka odnosi se na metabolizam FB<sub>1</sub> kod ljudi. Kod eksperimentalnih životinja, kada se FB<sub>1</sub> dozira oralno, slabo se apsorbira, ali se vrlo brzo izluči nemetaboliziran kroz feces i u maloj količini kroz urin. Budući da se FB<sub>1</sub> već za nekoliko sati izluči iz krvotoka, određivanje koncentracije FB<sub>1</sub> nije dobar pokazatelj izloženosti tom toksinu. Zato se kao mjera izloženosti ovom mikotoksinu koristi poremećaj metabolizma sfingolipida, koji nastaje kao posljedica njegovog djelovanja. Na pokusnim je životinjama, naime, utvrđeno da je poremećaj omjera koncentracija sfinganina i sfingozina pouzdan pokazatelj djelovanja FB<sub>1</sub>, što se može mjeriti u različitim biološkim materijalima (plazmi, urinu, pa čak i u organima). Mala, ali vrlo postojana koncentracija FB<sub>1</sub> ili njegovih metabolita se zadržava u jetri i bubrezima (Riley i sur., 1994; WHO, 2001).

Djelovanje fumonizina dovodi do poremećaja u rastu, diferencijaciji i funkciji te u konačnici i smrti stanice. Zbog drastičnih promjena na živčanom sustavu, dolazi do razvoja brze progresivne neurotoksikoze koja se manifestira kroz depresiju,

nemir, ekscitaciju, sljepoću, ataksiju, besciljno lutanje, facijalnu paralizu, prisilne kretanje, propulzije i retropulzije, komu i smrt (Morgavi i Riley, 2007). FB<sub>1</sub> je hepatotoksičan kod svih životinjskih vrsta. Kod štakora, miševa i zečeva uzrokuje rak jetre i bubrega, a kod svinja plućni edem. Budući da učinak FB<sub>1</sub> na pokusnim i domaćim životinjama jako varira, teško je povezati izloženost tom toksinu s bolestima ljudi. Nije poznato da li je ovaj toksin nefrotoksičan ili hepatotoksičan za ljude, no budući da su u nekim dijelovima Afrike, gdje je kukuruz osnovna namirnica, utvrđene njegove visoke koncentracije, povezuje ga se s izrazito velikom učestalošću tumora jednjaka u tom kraju. Velika učestalost tumora jednjaka u nekim područjima sjeverne Italije, kao i nastanak primarnih tumora jetre u nekim dijelovima Kine, također se povezuje s prehranom u kojoj je kukuruz, odnosno žganci, česta odnosno osnovna hrana (WHO, 2001). Kako bi se utvrdilo da li FB<sub>1</sub> uzrokuje rak jednjaka i druge bolesti kod ljudi, potrebno je u obzir uzeti više različitih faktora, kao što je i mogućnost da su toksični i derivati fumonizina. IARC je FB<sub>1</sub> uvrstio u skupinu 2B, kao moguće kancerogene tvari za ljude. Razlog tome je premalo epidemioloških studija na ljudima i veliki broj dokaza kancerogenosti na životinjama (IARC, 1993).

**T-2 toksin.** T-2 toksin je najtoksičniji predstavnik trihotecenskih mikotoksina tipa A. Sekundarni je produkt metabolizma plijesni roda *Fusarium*, često prisutan u žitaricama i hrani za životinje. Prvi put je izoliran iz plijesni *Fusarium tricinatum*, a produciraju ga plijesni iz roda *Fusarium* u širokom temperaturnom rasponu od 0-32 °C uz maksimalnu produktivnost ispod 15 °C. Nehlapljiv je i termostabilan te ga je teško suzbiti u proizvodnji hrane. Zagrijavanjem 30 - 40 minuta na 200-210 °C se inaktivira. Topljiv je u etanolu, etilacetatu, dimetilsulfoksidu, kloroformu i drugim organskim otapalima, a nije topljiv u vodi i petroleteru (Creppy, 2002).

T-2 toksin se resorbira kroz kožu. Lokalno uzrokuje upalu i koagulacijsku nekrozu kod životinja. Ukoliko se unese hranom, u buragu životinja se metabolizira u manje toksične metabolite HT-acetil-2 i HT-2 toksine. U metabolizmu T-2 toksina sudjeluju mikrosomalne esterase preko citokroma P-450. T-2 toksin ima izrazit afinitet prema 60S podjedinici ribosoma, što za rezultat ima inhibiciju sinteze bjelančevina u stanicama sisavaca. Djeluje tako što interferira s aktivnim središtem peptidiltransferaze ribosoma i na taj način sprječava ribosomalni ciklus, ometajući reakcije inicijacije i terminacije sinteze polipeptida. T-2 toksin svojim djelovanjem inhibira i sintezu nukleinskih kiselina (DNK i RNK) (Ožegović i Pepeljnjak, 1995). T-2 toksin je izravno citotoksičan, odnosno uništava stanicu pri kontaktu, a kao rezultat toga dolazi do nastanka dermatitisa i ulceracije sluznice. Osim citotoksičnog učinka, poznato je i imunosupresijsko djelovanje, koje rezultira atrofijom limfnog tkiva. Uzročnik je akutne intoksikacije i kroničnih bolesti kod ljudi i životinja. Naglašena supresija imunoreaktivnosti omogućava razne infekcije i dovodi do uginuća životinja (Creppy, 2002; Gremmels, 2008). Tijekom Drugog svjetskog rata među stanovništvom se pojavila neobična bolest nazvana alimentarna toksična aleukija (ATA) uzrokovanom otrovanjem životinja krmom. Glavni klinički simptomi uključuju smetnje u hemopoeznom sustavu s progresivnom leukopenijom, granulopenijom i limfocitozom. ATA je u životinja i ljudi bila uzrokovana konzumacijom pljesnivih prezimjelih žitarica i njihovih proizvoda, koje su bile onečišćene toksikogenim vrstama plijesni

*Fusarium poae* i *Fusarium sporotrichioides* i producirale T-2 i HT-2 toksine. Istraživanja na mačkama i majmunima kao pokusnim životinjama pokazala su da davanje T-2 toksina izoliranog iz *Fusarium sporotrichioides* uzrokuje nastanak ATA (Duraković i Duraković, 2003).

Podaci o karcinogenosti najzastupljenijih fuzarijskih mikotoksina prikazani su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Podaci o karcinogenosti fuzarijskih mikotoksina (IARC, 1993)

**Table 1.** Data on carcinogenicity of *Fusarium* mycotoxins (IARC, 1993)

Mikroorganizam/ Mikotoksin	Stupanj dokazane karcinogenosti <sup>a</sup>		Evaluacija <sup>b</sup>
	Ljudi	Životinje	
<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> Zearalenon Deoksinivalenol	ND	OD	Grupa 3
<i>F. sporotrichioides</i> T-2 toksin	NP	OD	Grupa 3
<i>F. moniliforme</i> Fumonizin B1 Fumonizin B2	ND	DD	Grupa 2B

<sup>a</sup> ND - nedovoljno dokaza; L - ograničeni dokazi; NP - nedostaje prikladnih podataka; DD - postoji dovoljno dokaza

<sup>b</sup> Grupa 2B - mogući ljudski karcinogeni; Grupa 3 - nisu klasificirani kao ljudski karcinogeni

## Intoksikacije u ljudi

Zdravstveni rizici povezani sa konzumacijom hrane onečišćene fuzarijskim mikotoksinima su poznate svugdje u svijetu i ovisne su o mjeri u kojoj je takva hrana konzumirana.

Epidemije intoksikacije ljudi povezane sa pšenicom onečišćenom sa *F. graminearum* i mikotoksinima koje ova plijesan producira zabilježene su u Indiji, Kini i Japanu, sa simptomima kao što je mučnina, bolovi u trbuhu, iritacija grla, proljev, vrtoglavica i glavobolja (Beardall i Miller, 1994). U Kini je nekoliko tisuća ljudi evidentirano kao žrtve epidemije izazvane konzumacijom onečišćene pšenice i kukuruza; pacijenti su imali zdravstvene tegobe 5-30 minuta nakon konzumacije, deoksinivalenol i zearalenon su određeni u dozama koje se smatraju toksičnim. Intoksikacija fuzarijskim mikotoksinima je dokazana u Indiji kod oko 50.000 ljudi koji su konzumirali kruh proizveden od kišom oštećenog zrna pšenice, što se manifestiralo blagim simptomima probavnog trakta. Preuranjeni znakovi puberteta zabilježeni su kod djece u Portoriku, dovodeći pojavu u poveznici sa djelovanjem zearalenona. Rak jednjaka se dijelom povezivao sa kukuruzom onečišćenim sa *F. moniliforme* i *Fusarium graminearum* odnosno mikotoksinima koje produciraju ove plijesni (fumonizina i zearalenona) u nekim regijama Južne Afrike i Kine (Beardall i Miller, 1994). Povećana ljudska potrošnja kukuruznog brašna u pojedinim regijama Italije je također bila povezana s povećanim rizikom od raka jednjaka u odnosu na druge dijelove zemlje i zapadne

Europe, iako nije utvrđena izravna uzročna uloga fumonizina u etiologiji tih tumora (Visconti i sur., 1998). Ipak, prinos fuzarijskih mikotoksina u hrani životinjskog podrijetla (primarno mlijeku i mesu) je slab te stoga ove namirnice ne predstavljaju značajnu opasnost za zdravlje ljudi ukoliko su farmske životinje hranidbom i primale stočnu hranu kontaminiranu ovim mikotoksinima (Prelusky i sur., 1990; Whitlow i sur., 2006).

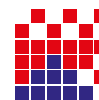
Sustavna kontrola mikotoksina u hrani i hrani za životinje je stoga neophodna kako bi se izbjegli negativni učinci fuzarijskih mikotoksina po zdravlje ljudi. Znanstvenici su ujedno zabrinuti zbog nalaza više različitih mikotoksina u istim namirnicama, budući je o sinergističkom djelovanju mikotoksinima objavljeno i vrlo malo istraživanja (Pleadin i sur., 2014b, Pleadin i sur., 2015). Za sprječavanje dolaska hrane onečišćene mikotoksinima na tržište, važan je i sustav obavještanja javnosti o opasnostima i rizicima te organizirano pristupanje utvrđivanja količina mikotoksina u hrani i hrani za životinje. Kao važan mehanizam, namijenjen upravo za ovu svrhu, je Sustav žurnog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje (RASFF) na nivou Europske unije, kojim se zemlje članice informiraju o pojavi ovih, ali i raznih drugih, opasnosti porijeklom iz hrane.

## Zakonska regulativa

Za najznačajnije mikotoksine je temeljem opsežne procjene sigurnosti i izloženosti provedena karakterizacija rizika, određeni su vrijednosti sigurne dnevne izloženosti (*Tolerable Daily Intake*, TDI) (EC, 2003) te definirane najveće dopuštene količine (NDK) koje se mogu nalaziti u EU u hrani (EC, 2006). U pogledu toksina plijesni *Fusarium*, Znanstveni odbor za hranu usvojio je nekoliko mišljenja, određujući TDI za DON od 1 µg/kg tjelesne težine, zearalenon od 0,2 µg/kg tjelesne težine, fumonizin B1 + B2 od 2 µg/kg tjelesne težine te T-2 +HT-2 od 0,06 µg/kg tjelesne težine (Tablica 2, EC 2003).

NDK vrijednosti za ove mikotoksine definirane su za neprerađene žitarice, neprerađenu tvrdu pšenicu, zob i kukuruz, žitarice namijenjene za neposrednu i izravnu prehranu ljudi, tjesteninu, kruh i ostale pekarske proizvode, prerađenu hranu na bazi žitarica te za frakcije meljave kukuruza (EC, 2006). Razine zearalenona određene zakonodavstvom kreću se u rasponu od 20 µg/kg u prerađenoj hrani na bazi žitarica za dojenčad i malu djecu do 200 µg/kg u kukuruzu za izravnu prehranu ljudi te različitim proizvodima od kukuruza. Najniže dozvoljene koncentracije DON-a propisane su za prerađenu hranu na bazi žitarica (200 µg/kg), a najviše za neprerađenu tvrdu pšenicu i zob te za neprerađeni kukuruz (1750 µg/kg). Najniže NDK vrijednosti za fumonizin (ukupno B1 i B2) propisane su za prerađenu hranu na bazi kukuruza (200 µg/kg), a najviše za neprerađeni kukuruz (4000 µg/kg). Ove vrijednosti nisu definirane za T-2 toksin.

Rezultati analiza u EU pokazuju da naročito kukuruz i proizvodi od kukuruza mogu biti u vrlo velikoj mjeri onečišćeni ovim mikotoksinima te je nužno poduzeti sve potrebne mjere kako bi se izbjegao ulazak tako jako onečišćenog kukuruza i proizvoda od kukuruza u prehrambeni lanac. Budući pojedini podaci upućuju na to da prisutnost T-2 i HT-2 može uzrokovati značajne štetne posljedice po zdravlje ljudi i životinja, od velikog su značaja njihova daljnja istraživanja te razvoj specifičnih i selektivnih metoda za njihovu detekciju i kvantifikaciju. Od nedvojbeno velikog značaja je i daljnje prikupljanje podataka



**Tablica 2.** TDI vrijednosti sa utvrđenim prosječnim rasponima za najznačajnije fuzarijske mikotoksine (EC, 2003)  
**Table 2.** TDI values with the established average ranges for the most important *Fusarium* mycotoxins (EC, 2003)

Mikotoksin	TDI (µg/kg tj.tež./dan)	Populacija (%)	Odrasli (%)	Djeca (%)
Zearalenon	0,2	13,4	5,3 - 14,5	3,0 - 27,5
Deoksinivalenol	1	0,8 - 33,8	14,4 - 46,1	11,3 - 95,9
Fumonizin B1+B2	2	0,8 - 13,2	0,1 - 14,1	22,3
T-2 + HT-2 toksin	0,06	18,3 - 250	61,7 - 171,7	26,7 - 563,3

o pojavljivosti fuzarijskih mikotoksina te nastavak istraživanja o čimbenicima koji pogoduju razvoju onečišćenja, kao i mogućim kumulativnim učincima ovih tvari iz različitih izvora onečišćenja.

## Prevenција i dekontaminacija fuzarijskih mikotoksina

Najbolja kontrola mikotoksina u lancu proizvodnje hrane podrazumijeva prevenciju njihova nastanka još na polju. Poznato je da su žitarice vrlo pogodan supstrat za rast plijesni, a samim time i za onečišćenje njihovim sekundarnim produktima odnosno mikotoksinima. Najčešće je u pitanju kukuruz, a potom i žitarice malog zrna (pšenica, sijerak, zob, ječam, riža) i uljarice (kikiriki, sjeme pamuka) (Duraković i Duraković, 2003). Iako se često onečišćenje ne može potpuno spriječiti, postoje različite preventivne mjere kako bi se one ipak ublažile te svele na najmanju moguću razinu. Metode nadzora u ovom području moguće je svrstati u dvije kategorije: (i) metode sprječavanja onečišćenja plijesnima i rasta plijesni i (ii) metode detoksikacije onečišćenih proizvoda (Pleadin i sur., 2014c).

Rast plijesni na različite je načine moguće spriječiti i prije i nakon žetve. Neke od preventivnih mjera su: upotreba hibrida žitarice otpornijih na plijesni; pravilan plodored; pravovremena primjena fungicida; prikladno vrijeme sjetve i vrijeme berbe, budući da se kasne sorte žitarica lakše inficiraju plijesnima tijekom vlažne jeseni; odabir prikladnog plodoreda; prikladna gnojidba, budući gnojidba s previše dušika povećava osjetljivost na plijesni te je stoga potrebno provesti analizu tla prije prihrane biljaka; primjena separatora pomoću kojih se uklanjaju oštećena i pljesniva zrna; adekvatno skladištenje uz optimalnu temperaturu i vlažnost žitarica (Boutrif, 1995; Binder, 2007).

U slučaju onečišćenja sirovina mikotoksinima, potrebna je primjena ciljanih mjera redukcije odnosno dekontaminacije, ovisno o mikotoksinu ili grupi mikotoksina. Primijenjena metoda redukcije treba učinkovito inaktivirati ili u potpunosti ukloniti mikotoksin, ne narušavajući pritom nutritivna i tehnološka svojstva proizvoda i ne stvarajući reaktivne toksične produkte (López-García i Park, 1998).

Općenito, metode redukcije mogu se podijeliti na kemijske, biološke i fizikalne (Kabak i sur., 2006), a najznačajnija je primjena adsorptivnih tvari. Dok su se pojedini adsorbenti pokazali vrlo učinkovitim u vezivanju i redukciji pojedinih mikotoksina (Ramos i sur., 1996), alternativne metode koje podrazumijevaju enzimatsku ili mikrobnu detoksifikaciju, iako manje učinkovite, također se koriste u dekontaminaciji (Boutrif, 1995; Miller, 1995; Binder, 2007).

Od fizikalnih metoda značajna je primjena visokih temperatura, UV, x i  $\gamma$ -zraka te mikrovalova. Vezivna sredstva

se dodaju kako bi se smanjila bioraspoloživost ovih spojeva kod životinja (hidrirani natrij kalcij aluminosilikat i filosilikati izvedeni iz prirodnih zeolita, bentonit i aktivni ugljen) no njihova primjena može biti i upitna zbog mogućih štetnih učinaka povezanih s velikom količinom dodanih sredstava, smanjenja bioraspoloživosti određenih minerala i vitamina u prehrani ili onečišćenja teškim metalima i dioksinima. Kemijske metode redukcije podrazumijeva primjenu različitih kemijskih sredstava, poput kiselina, baza, oksidana, reducirajućih sredstava, kloridnih sredstava i formaldehida, no njihova primjena je često neučinkovita i skupa pa se stoga rijetko primjenjuju (O'Neill et al., 1993; Visconti et al., 1996). Primjena bioloških metoda podrazumijeva korištenje određenih sojeva bakterija mliječne kiseline, propionskih bakterija i bifidobakterija sa strukturom stanične stijenke koja može vezati mikotoksine i na taj način ograničiti bioraspoloživost u tijelu životinja. Ujedno, pojedini kvasci i plijesni imaju sposobnost razgradnje mikotoksina, a na tržištu postoje i pripravci odgovarajućih enzima.

Međutim, važno je napomenuti i da su fuzarijski mikotoksini relativno stabilni pri uvjetima prerade hrane te se mogu pronaći u većini gotovih proizvoda na bazi žitarica. Ipak, primjena nekih metoda, kao što je visoka temperatura, može i značajno smanjiti njihove razine, primjerice kuhanje špageta i rezanaca od pšenice smanjuje razinu deoksinivalenola za 53% (Nowicki i sur. 1988), a palente od kukuruznog brašna smanjuje razine fumonizina B1 za 91% i B2 za 80% (Pascale i sur., 1995). Utvrđeno je da  $\gamma$ -zračenje može u različitim žitaricama reducirati T-2 toksin za 16%, zearalenon za 25% i deoksinivalenola za 33% (Hoosshmand i Klopfebstein, 1995), a u kukuruzu deoksinivalenol za 13% i fumonizin za 20% (O'Neill i sur., 1993; Visconti i sur., 1996).

## Analitičke metode u detekciji

Razvojem modernih laboratorijskih metoda te rastućim interesom u ovom području istraživanja detektirano je i više od 300 različitih mikotoksina (Binder i sur., 2007). Analitičke metode u analizama hrane uglavnom zahtijevaju ekstrakciju toksina iz materijala pomoću odgovarajućeg otapala, zatim primjenu neke od metoda pročišćavanja (kruto-fazna ekstrakcija - SPE, imunoafinitetne kolonice, ekstrakcija tekuće-tekuće - LLE) te konačno otkrivanje i određivanje toksina korištenjem odgovarajućih analitičkih instrumenata. Analitičke metode za određivanje mikotoksina mogu se podijeliti na kvalitativne i kvantitativne metode te nadalje na orijentacijske (*screening*) i potvrdne metode (Pleadin i sur., 2014a). Iako su u prethodnom razdoblju razvijene brojne specifične i osjetljive analitičke metode za određivanje količine mikotoksina u hrani za životinje i nadalje je značajna primjena imunoloških kvantitativnih ili polukvantitativnih metoda. Većina analiza mikotoksina i dalje se

temelji na fizikalno-kemijskim metodama koje se ujedno kontinuirano poboljšavaju (Krska i sur., 2005; Krska i sur., 2007; Pleadin i sur., 2014a)

Od orijentacijskih metoda najznačajnija je ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) kao imunološka metoda razvijena šezdesetih godina iz RIA (*Radioimmunoassay*) metode, na osnovu zapažanja da se antitijelo kao i analit (antigen) mogu vezati na krutu površinu i doprinositi specifičnom jakom afinitetu vezivanja. Pri korištenju komercijalno dostupnih imunoenzimskih kitova u kvantitativnim analizama mikotoksina postižu se vrlo niski limiti detekcije odnosno visoka osjetljivost metode, brza i jednostavna analiza uzoraka, niska cijena analize, automatiziranost analitičkog postupka, selektivnost na rezidue mikotoksina i dostupnost reagensa (Deshpande, 1996). Međutim, nedostaci ELISA testova su što kvaliteta kitova može varirati od proizvođača do proizvođača te između različitih serija kitova istog proizvođača. Ujedno, moguća je *cross*-reaktivnost sa srodnim spojevima i stereoisomerima, utjecaj okoline, prisutnost lažno pozitivnih rezultata te nužnost primjene potvrđnih metoda. U slučaju sumnje na pozitivni rezultat, takav rezultat se mora dokazati jednom od validiranih potvrđnih metoda koje daju informacije o kemijskoj strukturi analita (Posyniak i sur., 2003; Lattanzio i sur., 2009; Pleadin i sur., 2014b).

Kromatografske metode za određivanje mikotoksina u uzorku koriste se kao potvrđne metode, koje udovoljavaju zadanim kriterijima i omogućavaju selektivno određivanje mikotoksina. Temelj kromatografskih metoda je odjeljivanje i određivanje sastojaka smjese na temelju različitosti njihove raspodjele između dviju faza, stacionarne (nepokretne) i mobilne (pokretne) faze. Kromatografska analiza je postupak u kojem se najprije razdvajaju pojedini sastojci uzorka, a zatim kvalitativno i kvantitativno određuju. Razdvajanje sastojaka uzorka odvija se unutar kromatografskih kolona, a eluirani sastojci iz kolone se određuju pomoću detektora. Detektori mogu biti spektrofotometrijski, spektrofluorimetrijski i detektori koji mjere indeks refrakcije, a svi dijelovi kromatografskog sustava vezani su na *software* koji vrši potpuni nadzor tijekom kromatografskog procesa i obradu podataka. Obrada podataka se temelji na interpretaciji kromatograma dobivenih nakon kromatografske analize. Najčešća je primjena tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC), plinske kromatografije (*Gas Chromatography* - GC) i tankoslojne kromatografije (*Thin Layer Chromatography* - TLC). HPLC i GC su točne, precizne i visoko osjetljive metode, te imaju dobru ponovljivost, pa se koriste za precizne kvantitativne analize mikotoksina. TLC je jednostavnija metoda, ali nije toliko točna, pa se koristi za kvalitativne ili polu-kvantitativne analize (Sforza i sur., 2006; Köppen i sur., 2010). Posljednih se godina sve više koriste kromatografske metode u kombinaciji s masenom spektrometrijom kao najpouzdanije analitičke metode kojima se određuje, odnosno potvrđuje masa analita (Sforza i sur., 2006; Köppen i sur., 2010).

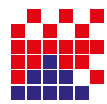
## Zaključak

Brojna istraživanja ukazuju na visoke razine onečišćenja hrane fuzarijskim mikotoksinima, primarno žitarica i proizvoda na bazi žitarica. U cilju proizvodnje zdravstveno ispravne

hrane i zaštite zdravlja potrošača potrebna je primjena metoda prevencije u svim kritičnim točkama odnosno fazama proizvodnje. Ukoliko ipak do onečišćenja hrane dođe, nužna je učinkovita primjena metoda u redukciji odnosno dekontaminaciji ovih toksičnih sastojaka. Potrebna su daljnja istraživanja bioraspoloživosti fuzarijskih mikotoksina u različitim namirnicama i sinergističkog učinka više različitih mikotoksina koji se mogu nalaziti u istoj namirnici te iako prisutni u nižim razinama uzrokovati intoksikacije kod potrošača. Budući je za T-2 toksin dostupno vrlo malo podataka, nužna si i daljnja istraživanja pojavnivosti te toksičnih učinaka ovog mikotoksina u ljudi i životinja.

## Literatura

1. Beardall J.M., Miller J.D. (1994) Diseases in humans with mycotoxins as possible causes. In: Miller J.D. and Trenholm H.L. (Eds.), *Mycotoxins in grain. Compounds other than aflatoxins*. Egan Press, Pt. Paul (MN) USA, pp.487-539.
2. Bennet J.W., Klich M. (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497-516.
3. Binder E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J., Richard, J. (2007) Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 265-282.
4. Binder E.M. (2007) Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*, 133, 149-166.
5. Bottalico A. (1998) *Fusarium* diseases of cereals: Species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 80, 85-103.
6. Boutrif E. (1995) FAO programmes for prevention, regulation and control of mycotoxins in food. *Nat. Toxins*, 3, 322-326.
7. Canady R.A., Coker, R.D., Egan, S.K., Krska, R., Kuiper-Goodman, T., Olsen, M., Pestka, J., Resnik, S., Schlatter, J. (2001) Deoxynivalenol. Safety evaluation of certain mycotoxins in food (pp. 419-555). Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), WHO Food Additives Series, vol. 47. World Health Organization (WHO), Geneva.
8. CAST (2003) Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. *Council for Agricultural Science and Technology*. Task Force Report No. 139. Ames, IA.
9. Cavret S., Lecoer, S. (2006) Fusariotoxin transfer in animal. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 444-453.
10. Creppy E.E. (2002) Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127, 19-28.
11. Delaš F. (2010) Mikrobni toksini. U: *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*, Hrvatska agencija za hranu, Osijek, 31-49.
12. Deshpande S.S. (1996) *Enzyme immunoassays. From concept to product development*. Chapman & Hall, New York.
13. Domijan A. M., Peraica M., Jurjević Ž., Ivić D., Cvjetković B. (2005) Fumonisin B1, fumonisin B2, zearalenone and ochratoxin A contamination of corn in Croatia. *Food Additives and Contaminants*, 22, 677-680.



14. Doohan F.M., Brennan J., Cooke B.M. (2003) Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 755-768.
15. Duraković S., Duraković L. (2003) Mikologija u biotehnologiji. Kugler, Zagreb.
16. EC (2003) Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. European Commission. Report on Task for Scientific Cooperation (SCOOP) 3.2.10 EC Brussels. Available from <http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/task3210.pdf>.
17. EC (2006) Commission Recommendation 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. Official Journal of the European Union L 229/7.
18. Erber E., Binder E.M. (2004) Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. In: The 5<sup>th</sup> Korea Feed Ingredient Association International Symposium, Korea Feed Ingredient Association, Seoul, Korea, July 16, pp. 21-45.
19. Geraldo M.R.F., Tessmann D.J., Kimmelmeier C. (2006) Production of mycotoxins by *Fusarium graminearum* isolated from small cereals (wheat, triticale and barley) affected with scab disease in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 58-63.
20. Glenn A.E. (2007) Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 213-240.
21. Gremmels J.F. (2008) The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *Veterinary Journal*, 176, 84-92.
22. Hagler, W.M., Mirocha C.J., Pathere S.V., Behrens J.C. (1979) Identification of the naturally occurring isomer of zearalenol produced by *Fusarium roseum* "Gibosum" in rice culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 849-853.
23. Hidy P.H., Baldwin R.L., Greasham R.L., Keith C.L., McMullen J.R. (1977) Zearalenone and some derivatives: Production and biological activities. *Advances in Applied Microbiology*, 22, 159-182.
24. Hussein S.H., Brasel M. (2001) Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 101-134.
25. Hoosshmand H., Klopfebstein C.F. (1995) Effects of gamma irradiation on mycotoxins disappearance and amino acid contents of corn, wheat and soybeans with different moisture contents. *Plant Foods Human Nutrition*, 47, 227-238.
26. IARC (International Agency for Research on Cancer) (1993) Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans, Vol. 56. IARC, Lyon.
27. Kabak B., Dobson A.D.W., Var I. (2006) Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 593-619.
28. Köppen R., Koch M., Siegel D., Merkel S., Maul R., Nehls I. (2010) Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1595-1612.
29. Krska R., Weizig E., Berthiller F., Molinelli A., Mizaikoff B. (2005) Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. *Food Additives and Contaminants*, 4, 345-353.
30. Krska R., Weizig E., Boudra H. (2007) Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 241-264.
31. Lattanzio V.M.T., Pascale M., Visconti A. (2009) Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 28, 758-768.
32. Lopez-Garcia R., Park D.L. (1998) Management of mycotoxin hazards through post-harvest procedures. U: Bhatnagar. D., Sinha K. K. (ed): Mycotoxins in agriculture and food safety, Chapter 9. New York, Marcel Dekker.
33. Markov K. (2005) Utjecaj odabranih parametara na rast plijesni u mješovitim kulturama i biosintezi patulina i zearalenona. *Disertacija*, Sveučilište u Zagrebu.
34. Mateo J.J., Mateo R., Jimenez M. (2002) Accumulation of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by *Fusarium sporotrichoides* isolates under diverse culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 115-123.
35. Miller J.D. (1995) Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored products research. *Journal of Stored Products Research*, 31, 1-6.
36. Morgavi D.P., Riley, R.T. (2007) An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feed contaminated with *Fusarium* toxins. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 201-212.
37. Nowicki T.W., Gaba D.G., Dexter J.E., Matsuo R.R., Clear R.M. (1988) Retention of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in wheat during processing and cooking of spaghetti and noodles. *Journal of Cereal Science*, 8, 189-202.
38. O'Neill K., Damoglou A., Patterson M.F. (1993) The stability of deoxynivalenol and 3-acetyldeoxynivalenol to gamma irradiation. *Food Additives and Contaminants*, 10, 209-215.
39. Ožegović L., Pepeljnjak S. (1995) Mikotoksikoze. Školska knjiga, Zagreb.
40. Pascale M., Doko M.B., Visconti A. (1995) Determinazione di fumonisine nella polenta mediante cromatografia HPLC. In: Dugo G, and Cotroneo A. (Eds) Atti 2° Congresso Nazionale di Chimica degli Alimenti. La Grafica Editoriale, Messina, Italy, pp. 1067-1071.
41. Pepeljnjak S., Šegvić M. (2004) An overview of mycotoxins and toxigenic fungi in Croatia. In A. Logrieco, & A. Visconti (Eds.), An overview of toxigenic fungi and mycotoxins in Europe (pp. 33-50). Kluwer Academic Publishers.
42. Pepeljnjak S., Cvetnić Ž., Šegvić Klarić M. (2008) Ochratoxin A and zearalenon: Cereals and feed contamination in Croatia (1977-2007) and influence on animal and human health. *Krmiva*, 50, 147-159.
43. Peršić N., Pleadin J., Vulić A., Zadravec M., Mitak M. (2011) Mikotoksini u žitaricama i hrani životinjskog podrijetla. *Veterinarska stanica*, 42, 335-345.

44. Placinta C.M., D'Mello J.P.F., Macdonald A.M.C. (1999) A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78, 21-37.
45. Pleadin J., Perši N., Mitak M., Zadravec M., Sokolović M., Vulić A., Jaki V., Brstilo, M. (2012a) The natural occurrence of T-2 toxin and fumonisins in maize samples in Croatia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88, 863-866.
46. Pleadin J., Sokolović M., Perši N., Zadravec M., Jaki V., Vulić A. (2012b) Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia. *Food Control*, 28, 94-98.
47. Pleadin J., Markov K., Frece J. (2014c) Aflatoksini - Onečišćenje, učinci i metode redukcije. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 9, 75-82.
48. Pleadin J., Markov K., Frece J., Vulić A., Perši N. (2014a) Bio-Prevalence, Determination and Reduction of Aflatoxin B1 in Cereals In: *Aflatoxins: Food Sources, Occurrence and Toxicological Effects*/Adina G. Faulkner (ed.). USA: Nova Science Publishers, 1-34.
49. Pleadin J., Perši N., Vulić A., Zadravec M. (2012c) Survey of mycotoxin feed contamination in Croatia. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 28, 167-177.
50. Pleadin J., Vulić A., Perši N., Škrivanko M., Capek B., Cvetnić Ž. (2014b) Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food Control*, 40, 286-291.
51. Pleadin J., Vulić A., Perši N., Škrivanko M., Capek B., Cvetnić Ž. (2015) Annual and regional variations of aflatoxin B1 levels seen in grains and feed coming from Croatian dairy farms over a 5-year period. *Food Control*, 47, 221-225.
52. Pleadin J., Zadravec M., Perši N., Vulić A., Jaki V., Mitak M. (2012d) Mould and mycotoxin contamination of pig feed in northwest Croatia. *Mycotoxin Research*, 28, 157-162.
53. Posyniak A., Zmudzki A.J., Niedzielska J. (2003) Screening procedures for clenbuterol residue determination in bovine urine and liver matrices using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 483, 61-67.
54. Prelusky D.B., Scott P.M., Trenholm H., Lawrence G.A. (1990) Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 25, 87-103.
55. Ramos A.J., Fink-Gremmels J., Hernandez E. (1996) Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of non-nutritive adsorbent compounds. *Journal of Food Protection*, 59, 631-641.
56. Riley R.T., Wang E., Merrill A.H. (1994) Liquid chromatographic determination of sphinganine and sphingosine: use of the free sphinganine - to - sphingosine ratio as a biomarker for consumption of fumonisins. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 77, 533-540.
57. SCF (Scientific Committee on Food) (2002) Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol. European Commission, Brussels, 27 February 2002SCF/CS/CNTM/MYC/27 Final.
58. Schothorst R.C., van Egmond H.P. (2004) Report from SCOOP task 3.2.10 "collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states". Subtask: trichothecenes. *Toxicology Letters*, 153, 133-143.
59. Sforza S., Dall'Astra C., Marchelli R. (2006) Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 25, 54-76.
60. Sudakin D.L. (2003) *Trichothecenes in the environment: Relevance to human health*. *Toxicology Letters*, 143, 97-107.
61. Szuets P.A., Mesterhazy A., Falkay G., Bartok T. (1997) Early thelarche symptoms in children and their relations to zearalenone contamination in foodstuff. *Cereal Research Communications*, 25, 429-436.
62. Tanaka T., Hasegawa A., Yamamoto S., Lee U.S., Sugiura Y., Ueno Y. (1988) Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 979-983.
63. Visconti A., Avantaggiato G., Solfrizzo M. (1998) Biomarker to display the ingestion of fumonisins through contaminated diet. - Analysis of sphinganine/sphingosine ratio in biological samples. In: Marengo G., Pastoni F. (Eds.), *Proceedings of Sixth International Symposium on Microbiology of Food and Cosmetics in Europe*. 260-280.
64. Visconti A. Solfrizzo M.; Doko M.B., Boenke A., Pascale M. (1996) Stability of fumonisins at different storage periods and temperatures in gamma irradiated maize. *Food Additives and Contaminants*, 13, 929-938.
65. Vulić A., Pleadin J., Perši N. (2011). Determination of T-2 and HT-2 toxins in commodities and feed in Croatia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86, 294-297.
66. Whitlow L.W., Diaz D.E., Hopkins B.A., Hagler W.M. (2006) Mycotoxins and milk safety: the potential to block transfer to milk. <<http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/mycotoxins-milk-safety-potential-t199/p0.htm>>. Pristupljeno lipanj 2015.
67. WHO (2001) Environmental health criteria 219, Fumonisin B1. World Health Organization, Geneva. <[http://whqlibdoc.who.int/ehc/WHO\\_EHC\\_219.pdf](http://whqlibdoc.who.int/ehc/WHO_EHC_219.pdf)>. Pristupljeno lipanj 2015.
68. Zinedine A., Soriano J.M., Molto J.C., Manes J. (2007) Review on toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1-18.