








SUSTAVNA KONTROLA MIKOTOKSINA I BILJNNIH TOKSINA U HRANI I HRANI ZA ŽIVOTINJE

MARTINA IVEŠIĆ

Referentni laboratorij za mikotoksine
Nastavni zavod za javno zdravstvo “Dr. Andrija Štampar”

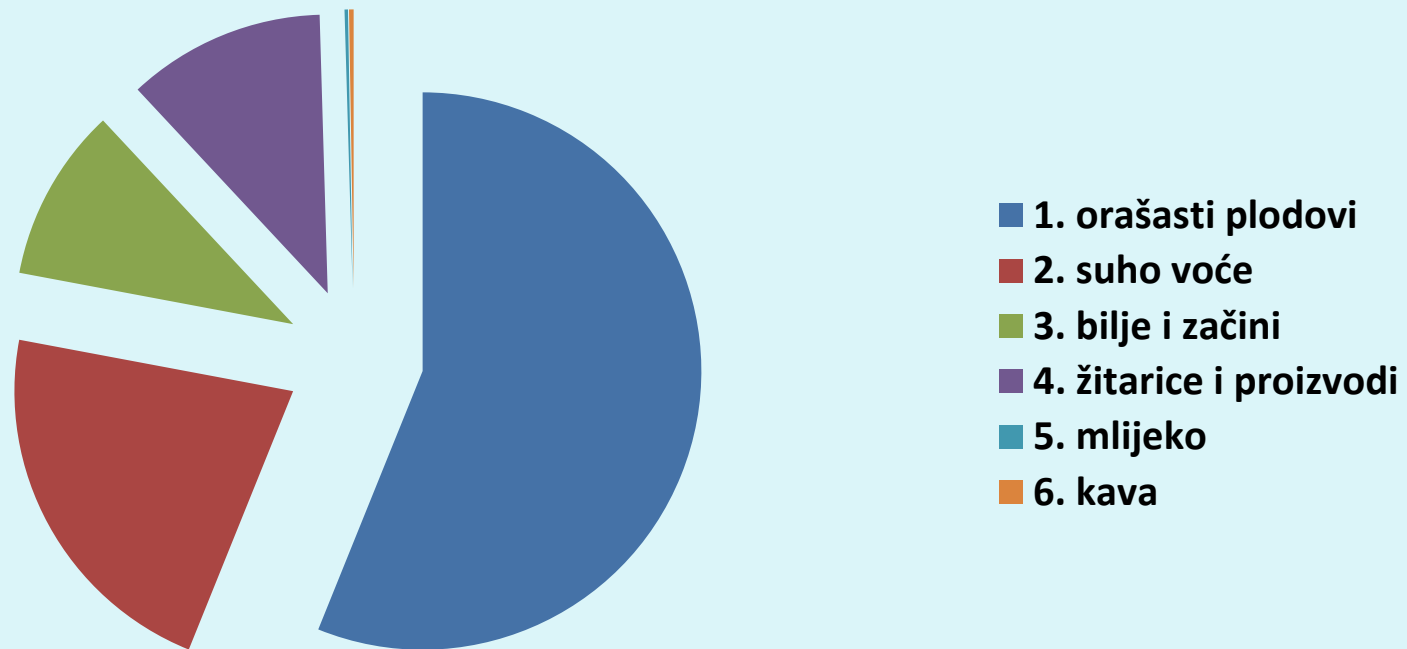
Najčešće plijesni i njihovi sekundarni metaboliti-mikotoksini

<p>Stachybotrylactam <i>Stachybotrys</i> spp.</p> 	<p>Phomopsisin A <i>Phomopsis</i> spp.</p> 	
 <p>Aflatoxin B1, B2, G1, G2 Gliotoxin Sterigmatocystin <i>Aspergillus</i> spp.</p>	 <p>Ergocornine Ergocorninine Ergocristine Ergocristinine Ergocryptine Ergocryptinine Ergometrine Ergosine Ergosinine Ergotamine Ergotaminine Agroclavine <i>Claviceps</i> spp.</p>	<p>3-acetyldeoxynivalenol 15-acetyldeoxynivalenol Beauvericine Deoxynivalenol DON-3-glucoside Diacetoxyscirpenol Enniatine A, A1, B, B1 Fumonisin B1, B2, B3 Fusarenon-X HT-2 toxin Neosolaniol Nivalenol T-2 toxin Verrucarol Zearalenone α-zearalenol β-zearalenol <i>Fusarium</i> spp.</p>
<p>Alternariol Alternariol-methylether Tentoxin Tenuazonic acid <i>Alternaria</i> spp.</p> 	<p>Cyclopiazonic acid, Citrinin, Meleagrins, Mycophenolic acid, Ochratoxin A, Patulin, Paxilline, Penicillic acid, Penitrem A, Roquefortine C, Verruculogen <i>Penicillium</i> spp.</p> 	

EU Standard

- Europska zajednica ima jedan od najvećih standarda za sigurnost hrane u svijetu, zahvaljujući u najvećoj mjeri Europskom zakonodavstvu koje postavlja najveće dopuštene količine pojedinih mikotoksina u hrani i hrani za životinje u cilju zaštite zdravlja potrošača i zdravlja životinja, namećući tako zakonske obveze za subjekte u poslovanju s hranom kako bi se osiguralo da hrana i hrana za životinje koja se stavlja na tržište bude sigurna za ljudsku i životinjsku potrošnju.
- RASFF –SUSTAV BRZOG UZBUNJIVANJA ZA HRANU I HRANU ZA ŽIVOTINJE (The Rapid Alert System for Food and Feed)
mreža za informiranje o izravnom ili neizravnom riziku za zdravlje ljudi koji potječe od hrane ili hrane za životinje.

RASFF od 01.01.2011. do 01.11.2014



Top 10 RASFF obavijesti u 2015.god. s obzirom na zemlju podrijetla (prliminarni rezultati)

OPASNOST	KATEGORIJA PROIZVODA	PODRIJETLO	OBAVJEST
Aflatoksini	Orašasti proizvodi i sjemenke	Kina	97
Salmonella	Voće i povrće	Indija	78
Salmonella	Orašasti proizvodi i sjemenke	Indija	65
Živa	Riba i riblji proizvodi	Španjolska	58
Aflatoksini	Orašasti proizvodi i sjemenke	Iran	55
Aflatoksini	Orašasti proizvodi i sjemenke	Turska	53
Aflatoksini	Voće i povrće	Turska	48
Aflatoksini	Orašasti proizvodi i sjemenke	SAD	37
Salmonella	Perad i proizvodi od peradi	Brazil	37
Migracija kroma	Materijali koji dolaze u kontakt s hranom	Kina	33

Broj prijavljenih uzoraka – opasnost od mikotoksina - u periodu od 2012. do 2015.god

GODINA	2012	2013	2014	2015
HRANA ZA ŽIVOTINJE	79	37	26	19
HRANA	446	368	357	476

Prijave opasnosti od mikotoksina u 2015.g.

Zemlja	AT	BE	BG	CH	CY	CZ	DE	DK
Broj mikotoksina	5	48	15	4	10	1	70	6
Zemlja	EE	ES	FI	FR	GB	GR	HR	HU
Broj mikotoksina	1	35	5	39	53	22	5	1
Zemlja	IE	IS	IT	LT	LU	LV	MT	NL
Broj mikotoksina	4		62	4	6	1	1	53
Zemlja	NO	PL	PT	RO	SE	SI	SK	
Broj mikotoksina	3	13	7	5	4	8	4	

PLAN SLUŽBENIH KONTROLA HRANE ŽIVOTINJSKOG I NEŽIVOTINJSKOG PODRIJETLA U ODNOSU NA PRISUTNOST MIKOTOKSINA ZA RAZDOBLJE OD 2015. DO 2018. GODINE

- MINISTARSTVO ZDRAVLJA
- MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE
- U suradnji s:
 - Hrvatskom Agencijom za hranu
 - Nacionalnim referentnim laboratorijem za mikotoksine (NZJZ dr. A. Štampar)
 - Hrvatskim zavodom za javno zdravstvo
 - Hrvatskom Veterinarskim Institutom

Zakonodavni temelj za provođenje službenih kontrola

- Zakonodavni temelj za provođenje službenih kontrola hrane odnosno provođenje kontrolnih aktivnosti i poduzimanje mjera:
- Uredba 882/2004 Europskog parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o službenim kontrolama koje se provode radi verifikacije postupanja u skladu s odredbama propisa o hrani i hrani za životinje te propisa o zdravlju i dobrobiti životinja (SL L 165, 30. 4. 2004.) i
- Zakon o službenim kontrolama koje se provode sukladno propisima o hrani, hrani za životinje, o zdravlju i dobrobiti životinja („Narodne novine „ br. 81/13).

Zakonodavni propisi

- Zakon o kontaminantima („Narodne novine“ br. 39/13)
- Zakon o hrani (NN 81/13)
- Zakon o općem upravnom postupku („Narodne novine „ br. 47/09)
- Uredbu Komisije (EZ) br. 401/2006 od 23. veljače 2006. kojom se utvrđuju metode uzimanja uzoraka i analize za potrebe obavljanja službenih kontrola razina mikotoksina u hrani (SL L 70, 9. 3. 2006.) svim njenim daljnjim izmjenama i dopunama
- Uredbu Komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o najvećim dopuštenim količinama kontaminanata u hrani (SL L 364, 20. 12. 2006.), sa svim izmjenama i dopunama
- Preporuka EK 2013/165/EU o praćenju T2 i HT2 toksina
- Preporuka EK 2012/154 za praćenje Ergot sclerotia i Ergot alkaloida
- Preporuka Komisije br. 2006/583/EZ od 17. kolovoza 2006. o sprečavanju i smanjenju toksina plijesni *Fusarium* toksina u žitaricama i proizvodima od žitarica

Plan se temelji na zahtjevima za praćenje kategorija hrane propisanih:

- Uredbom Komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006 (izmjene i dopune)
- Rezultatima službenih kontrola provedenih u razdoblju od 2011. do 2013. godine
- Preporukama EK
- Podacima iz RASFF sustava
- Podacima proizvodnje, uvoza i izvoza hrane ne-životinjskog i životinjskog podrijetla

Planom su obuhvaćene sljedeće kategorije hrane:

- Žitarice i proizvodi od žitarica (neprerađene žitarice, prerađene žitarice, proizvodi na bazi žitarica za dojenčad i malu djecu)
- Pšenični gluten (koji se ne prodaje izravno potrošaču)
- Mlijeko (sirovo mlijeko, u proizvodnji prije prerade, na tržištu, na mljekomatima)
- Početna i prijelazna dječja hrana na bazi mlijeka
- Hrana za posebne medicinske potrebe na bazi mlijeka (za dojenčad)
- Vino
- Orašasti plodovi (kikiriki, bademi, lješnjaci, koštice marelice, pistacije, Brazilski oraščići i dr.)
- Sušeno smokve, grožđice, ostalo sušeno voće
- Začini
- Pržena kava, Instant kava i proizvodi od kave
- Kašasti proizvodi od jabuka za dojenčad i malu djecu, ostali voćni sokovi, konc. voćni sokovi i rekonstruirani voćni nektari
- Voćni sokovi i dječje kašice
- Rafinirano kukuruzno ulje
- Dodaci prehrani na bazi crvene fermentirane riže

Mikotoksini obuhvaćeni planom monitoringa

- Aflatoksini (B1 i ukupni)
- Ochratoxin A
- Deoxynivalenol
- Zearalenon
- Fumozini B1 + B2
- Patulin
- Aflatoksin M1
- Citrinin
- T2 i HT2 toksini
- Ergot Alkaloidi

Preporuke EK – dodatna istraživanja od opasnosti od ostalih mikotoksina koji nemaju propisane NDK

- Traži se od članica EU da sa subjektima u poslovanju s hranom aktivno sudjeluju u prikupljanju podataka o vrijednostima:
- T2 i HT-2
- Sterigmatocistina
- Ergot alkaloida
- Tropanskih alkaloida
- Podaci se šalju EFSA-i

T2 i HT2

- Žitarice i proizvodi od žitarica (izuzev riže i proizvoda od riže)
- Preporuka za izvedbene kriterije metoda analize:
- Hrana-GK za potvrdne metode: ne viša od 5 µg/kg (za svaki posebno) izuzev neprocesuiranih žitarica, ne viša od 10 µg/kg (za svaki posebno)
- Hrana-GK za *screening* metode: ne viša od 25 µg/kg (suma T2 i HT2)
- Hrana za životinje-GK za potvrdne metode: ne viša od 10 µg/kg (za svaki posebno)
- Hrana za životinje-GK za *screening* metode: ne viša od 25 µg/kg (suma T2 i HT2)

Sterigmatocistin (STC)

- Sustavna kontrola prisutnosti u hrani
- Proizvodi ga više od 50 vrsta gljivica, najviše *Aspergillus flavus* i *A. versicolor*.
- Pojavljuje se u žitaricama i proizvodima na bazi žitarica te u začinima, orašastim plodovima i zrnima zelene kave te moguće pojavljivanje u siru i pivu
- Strukturno sličan aflatoksinima
- Preporuka za izvedbene kriterije metoda analize:
- GK koju treba postići je 1,5 µg/kg sa LC-MS multi-mycotoxin metodom

DON – proširenje monitoringa

- Radi daljnjeg istraživanja od izloženosti DON-om u žitaricama
- Acetilirani oblici DON-a: **3-Acetil-DON** i **15-Acetil-DON**
- Maskirani oblik DON-a: **DON-3-Glukozid**

Ergot alkaloidi (EAs)

- Istraživanje se nastavlja intenzivno tijekom 2015. i 2016. s monitoringom u žitaricama (izuzev kukuruza i riže)
- Metoda analize koja će se koristiti treba imati granicu kvantifikacije (GK) od 20 $\mu\text{g/kg}$ po ergot alkaloidu kao najmanji prihvatljivi kriterij, no ukoliko je moguće trebala bi biti 10 $\mu\text{g/kg}$ ili niža

Tropanski alkaloidi (TAs), Atropin i Skopolamin

- Dosad je utvrđeno više od 200 tropanskih alkaloida
- (-)-hiosciamin i (-)-skopolamin
- Atropin je racemična smjesa (-)-hiosciamina i (+)-hiosciamina od kojih samo (-)-enantiomer hiosciamina pokazuje **antikolinergičko djelovanje**
- Dobro je poznata prisutnost tropanskih alkaloida u rodu *Datura*
- Sjemenke biljke *Datura stramonium* pronađene su kao nečistoće u sjemenkama lana, soji, sirku, prosu, suncokretu i heljdi te njihovim proizvodima
- Ne mogu se lako odstraniti iz sirka, prosa i heljde sortiranjem i čišćenjem te je stoga utvrđeno da su **sirak, proso i heljda te proizvodi dobiveni od njih i hrana na bazi žitarica koja ih sadržava kontaminirani tropanskim alkaloidima**

Najveća dopuštena količina TAs ($\mu\text{g/kg}$)

- Prerađena hrana na bazi žitarica i dječja hrana za dojenčad i malu djecu koja sadržava proso, sirak, heljdu ili proizvode dobivene od njih
- Atropin 1,0 $\mu\text{g/kg}$
- Skopolamin 1,0 $\mu\text{g/kg}$

Preporuke za određivanje TAs u hrani

- Metoda izbora HPLC-MS/(MS) (GCMS u slučaju nedostupnosti HPLC-MS/(MS))
- GK ne viša od 10 $\mu\text{g/kg}$ za svaki TAs pojedinačno
- Poželjno da bude manja od 5 $\mu\text{g/kg}$
- Ciljane skupine hrane za monitoring:
 - Žitarice i proizvodi od žitarica
 - Bezglutenski proizvodi
 - Dodaci prehrani i biljni čajevi
 - Mahunarke, grah (lupins) i sjemenke uljarica te od njih dobivene proizvode

Alternaria toksini

- <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2407.pdf>
- Alternaria-toksini mogućeg toksikološkog značaja koji bi se trebali analizirati
 - - Alternariol (AOH)
 - - Alternariol monomethyl ether (AME)
- Alternaria-toksini čija je pojavnost u hrani za životinje i/ili hrani od značaja i koje je prikladno analizirati
 - - Tenuazonic acid (TeA)
 - - Tentoxin (TEN)
 - - Alternuene (ALT)
- Ostali Alternaria toksini poput Alternariotoxins (ATX), Alternaria alternata f sp lycopersici toxins (AAL toxin)) – manjeg toksikološkog značaja (manje pojavnosti)
- SPE-LC-MS – mogućnost analize svih relevantnih alternaria toksina u širokom rasponu matrica
- LC-UV (-DAD) ili LC-FL – ograničen broj alternaria toksina

Pirolizidinski alkaloidi (PAs)

- <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2406.pdf>
- **Senecionine-type PAs:** acetylerucifoline, erucifoline, integerrimine, jacobine, jacoline, jaconine, jacozone, retrorsine, senecionine, seneciphylline.
- **Lycopsamine-type PAs:** acetylechimidine and isomers, echimidine and isomers, echivulgarine, lycopsamine and isomers, vulgarine.
- **Heliotrine-type PAs:** europine, heliotrine, lasiocarpine.
- **Monocrotaline-type PAs:** fulvine, monocrotaline, retusamine, trichodesmine.

Preporuke za određivanje PAs

- LC-MS/MS (MRM)
- Relevantne GK koje se trebaju postići za svaki pojedini pirolizidinski alkaloid:
- 1 $\mu\text{g/kg}$ za med
- 0,01 $\mu\text{g/kg}$ za mlijeko i mliječne proizvode
- 0,1 $\mu\text{g/kg}$ za ostalu hranu te hranu za životinje
- Nedostupnost certificiranih referentnih materijala

Uzorkovanje

- Uzorkovanje na tržištu se isključivo provodi u:
- proizvodnji
- preradi
- veleprodaji
- skladištima gdje se nalaze cijeli lotovi/šarže (uklj. hipermarketi)
- Podjela serije u podserije ovisi o vrsti hrane i masi zatečene serije

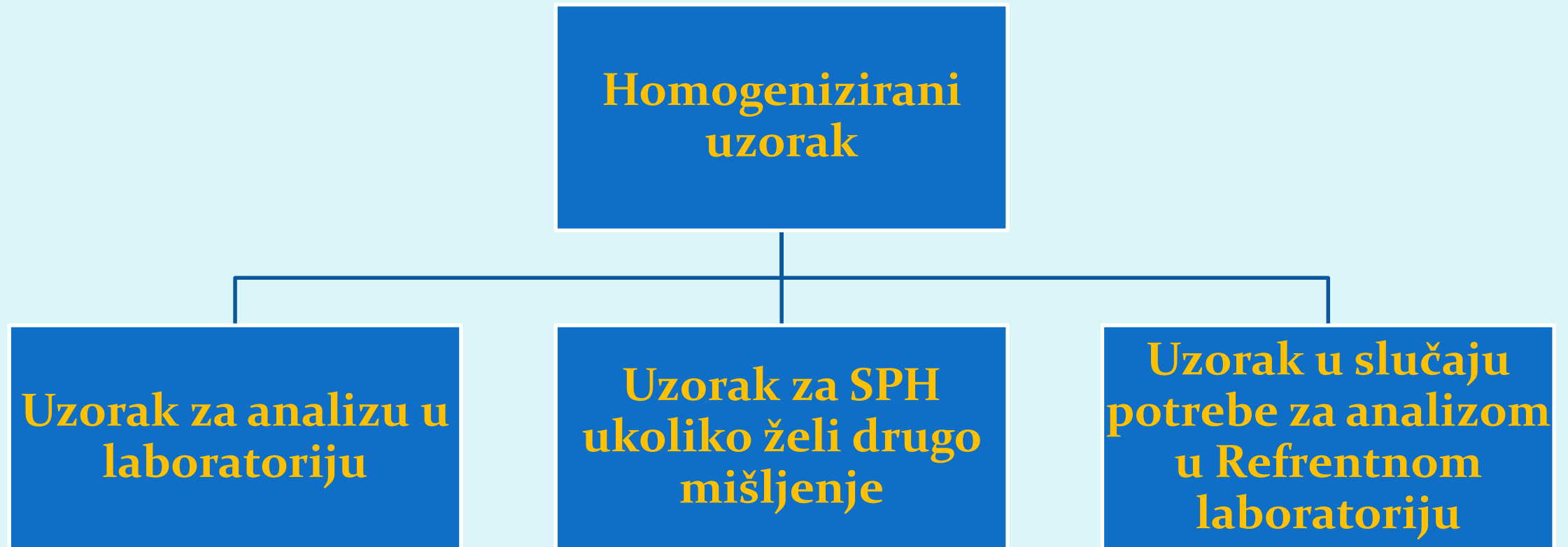
Uzorkovanje uzoraka prema Uredbi komisije (EZ) br.401/2006 (izmj.i dopuna 16.svibnja 2014.)

- **POJAŠNJENJE OSNOVNIH POJMOVA PRILIKOM UZORKOVANJA**
- “SERIJA” – prepoznatljiva količina proizvoda isporučena odjednom i za koju je službena osoba utvrdila da ima zajedničke karakteristike (podrijetlo, sorta, vrsta pakiranja,...)
- “PODSERIJA” – dio velike serije koji je namijenjena za uzorkovanje (svaka podserija mora biti odvojena)
- “POJEDINAČNI UZORAK” – količina uzorka uzeta s jednog mjesta u seriji ili podseriji
- “SKUPNI UZORAK” – dobiva se objedinjavanjem svih pojedinačnih uzoraka uzetih iz serije ili podserije
- “LABORATORIJSKI UZORAK” – uzorak namijenjen laboratoriju u svrhu provođenja analiza
- Metode uzorkovanja se odnos na aflatoksin B1, skupne aflatoksine, ohratoksin A i mikotksine *Fusarium* plijesni

Slijed homogenizacije uzoraka za masu serije ≥ 50 t



Podjela homogeniziranog uzorka



Službeni i referentni laboratoriji za hranu i hranu za životinje (zakonska regulativa)

- Temeljem Zakona o hrani (Narodne novine, broj 46/07, 84/08, 55/11),
- Zakona o službenim kontrolama koje se provode sukladno propisima o hrani, hrani za životinje, o zdravlju i dobrobiti životinja (Narodne novine, broj 81/13),
- Pravilnika o ovlašćivanju službenih i referentnih laboratorija za hranu i hranu za životinje (Narodne novine, br. 86/10, 7/11 i 74/13) te
- Zakona o općem upravnom postupku (Narodne novine, broj 47/09), ministar poljoprivrede donosi rješenja o ovlaštenju službenih i referentnih laboratorija za hranu i hranu za životinje.
- <http://www.veterinarstvo.hr/default.aspx?id=1269>

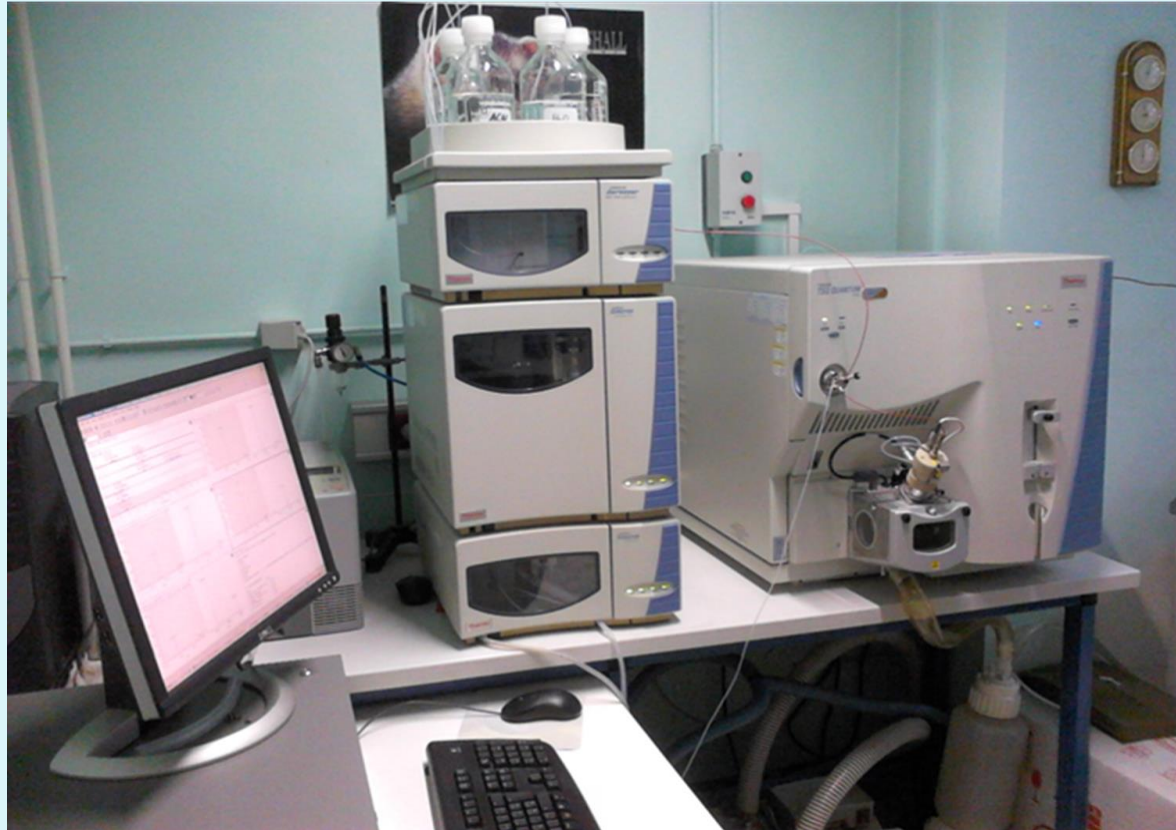
Laboratoriji koji obavljaju analize mikotoksina u svrhu službenih kontrola - uvjeti

- Moraju biti ovlašteni od strane Ministarstva poljoprivrede
- Mora biti akreditiran prema HRN EN ISO/IEC 17025 minimalno za jednu vrstu mikotoksina vezano uz analitičku tehniku, a za sve ostale mikotoksine mora uspješno sudjelovati u programima međulaboratorijskih usporedbi i imati provedenu validaciju metoda
- Moraju imati:
 - osposobljeno i educirano osoblje za analizu mikotoksina
 - odgovarajuće prostore
 - odgovarajuću opremu za pripremu, obradu i homogenizaciju uzoraka na način propisan Uredbom 401/2006 i njenim Izmjenama i dopunama

Oprema laboratorija uključuje:

- Tehnike: ELISA, HPLC, LC/MS te LC/MS/MS (Svi pozitivni rezultati aflatoksina dobiveni ELISA tehnikom, moraju se potvrditi potvrdnom tehnikom HPLC- FLD, LC/MS ili LC/MS/MS)
- Opremu za usitnjavanje i homogenizaciju uzoraka (mikseri za mljevenje uzoraka sa ljuskom do 10 kg i mikser za mljevenje uzoraka sa ljuskom do 30 kg)

LC-MS/MS



UPLC-MS/MS-QTRAP



UPLC-MS/MS



TOF



Obveze subjekata u poslovanju s hranom i hranom za životinje

- Subjekt u poslovanju s hranom (SPH) obavezan je (uvoznici, prerađivači hrane, proizvođači ili subjekt koji obavlja djelatnost veleprodaje):
- Nadležnim tijelima omogućiti provođenje nesmetanog nadzora, te uvid u svu dokumentaciju uključujući i onu u elektronskom obliku
- Staviti na raspolaganje potrebne količine hrane i sirovina u svrhu uzorkovanja
- Obavezan je provoditi interne kontrole prema procjeni opasnosti, uključujući i plan uzorkovanja (osigurati internu kontrolu na pravilan i siguran način) ➡
- ➡ Ugovor sa laboratorijem koji je akreditiran za uzorkovanje i analize mikotoksina sukladno važećim zakonskim propisima

Obveze službenih kontrola (inspekcijske službe):

- Provode službena uzorkovanja prema posebnim propisima
- Uzorci se dostavljaju službenim i/ili referentnim laboratorijima **unutar 72 sata** od uzorkovanja na siguran način (tamne vreće, transport bez izlaganja suncu i vlazi, odvojen od izvora moguće kontaminacije, na prihvatljivoj temperaturi)
- Ovlaštena osoba za službene kontrole mora SPH obavijestiti **unutar 72 sata** u kojem se laboratoriju analiza odvija
- Ukoliko SPH želi uzorak za dodatno mišljenje mora ga zatražiti od laboratorija **unutar 5 radnih dana**, a laboratorij mora uzorak predati SPH unutar tri dana i o tome obavijestiti inspekcijske službe
- Svaki se uzorak koji prelazi NDK – uzimajući u obzir mjernu nesigurnost – objavljuje na RASFF sustavu

Obveze službenih kontrola (inspekcijske službe):

- Nakon provedene analize koja se radi iz **homogeniziranog uzorka**, mjerodavan je rezultat analize ukoliko se SPH odrekao prava na dodatno stručno mišljenje.
- Ukoliko se rezultati analize razlikuju od rezultata dodatne analize, SPH je obavezan svoje rezultate predložiti ovlaštenoj osobi za provođenje službenih kontrola **unutar 15 radnih dana** od dana uzorkovanja.
- U tom slučaju treći homogeni uzorak dobiven homogenizacijom šalje se u **Referentni laboratorij** i mjerodavan je rezultat trećeg mjerenja.
- Troškove uzorkovanja, monitoringa i provođenja analiza snosi nadležno tijelo, osim u slučaju kada su rezultati veći od NDK troškove snosi SPH.
- Izuzetak su troškovi analize kod uvoza kada troškove snosi uvoznik.

Koordinacija i razmjena podataka

- Rezultate i podatke o provedbi ovog Plana mogu u javnost iznositi samo i isključivo nadležna tijela i to svako tijelo isključivo za dio plana koje je samo provelo.
- Ministarstvo zdravlja dostavlja rezultate o provedbi plana monitoringa Ministarstvu poljoprivrede u svrhu Izvješćivanja Europske Komisije.
- Nacionalni referentni laboratorij za mikotoksine (Nastavni zavod za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar) sakuplja podatke od svih službenih laboratorija kako bi sačinilo sveobuhvatni izvještaj za EFSU u propisanim obrascima (SSD1) za prethodnu godinu.
- Hrvatska Agencija za hranu sakupljene i obrađene podatke monitoringa mikotoksina dostavlja EFSA-i.

Obveze Referentnog laboratorija

- Suradnja s referentnim laboratorijem Europske zajednice iz područja mikotoksina
- Koordinacija aktivnosti službenih laboratorija u području mikotoksina
- Prema planu, provedba međulaboratorijske usporedbe sa službenim laboratorijima i osiguranje potrebnih daljnjih aktivnosti poslije takvih usporedbi
- Dostava informacija dobivenih iz referentnog laboratorija Europske zajednice (Community Reference Laboratory - CRL-a) Ministarstvu i službenim laboratorijima
- Pružanje znanstvene i tehničke pomoći Ministarstvu u primjeni programa koordinirane kontrole
- Prikupljati podatke o provedenim službenim kontrolama mikotoksina ovlaštenih laboratorija koji se u posebnom obrascu dostavljaju Hrvatskoj agenciji za hranu, a sve prema zahtjevima EFSA-e

HVALA!



dr.sc. Martina Ivešić, dipl.ing.

Voditeljica Referentnog laboratorija za mikotoksine
Odjel za zajedničke i potvrdne analitičke metode
Služba za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju

Tel: +385 1 4696 278

email: martina.ivesic@stampar.hr

Mirogojska cesta 16

HR-10000 Zagreb

www.stampar.hr