مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۷ – شماره ۳ – پاییز ۱۳۹۲

Journal homepage: www.ijmm.ir

ردیابی سم اکراتوکسین A در نان‌های مصرفی شهرکرد در سال ۱۳۹۰

مهران عرفانی[۱]، ابراهیم رحیمی[۱]، محمدعلی افشاری[۲]، رضا کچوئی[۳]

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. دانشجوی دکتری گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت:۱۳۹۲/۰۴/۱۰
پذیرش:۱۳۹۲/۰۷/۱۰
انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۲/۱۵
موضوع:
قارچ‌شناسی پزشکی

IJMM 1392; 7(3): P 42-47

نویسنده مسئول:
رضا کچوئی
مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)
تلفن: ۰۹۱۲۸۰۳۱۲۴۷
پست الکترونیک:
kachueiz@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: اکراتوکسین A مایکوتوکسینی است که به علت اثرات نفروتوکسیک، ایمونوتوکسیک، جهش‌زا، تراتوژنیک و کارسینوژنیک خطر بالقوه‌ای برای سلامت انسان دارد. این مطالعه باهدف تعیین حضور و میزان اکراتوکسین A در نان‌های مصرفی شهر شهرکرد انجام گردید.

مواد و روش کار: در این مطالعه، ۸۶ نمونه انواع نان عرضه‌شده در نانوایی‌های شهر شهرکرد در پاییز ۱۳۹۰ جمع‌آوری و ازنظر حضور اکراتوکسین A به‌وسیله روش الیزا موردبررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: اکراتوکسین A در ٤٥ نمونه از ۸٦ نمونه (۵۲/۳ درصد) نان بررسی‌شده ردیابی شد. محدوده غلظت اکراتوکسین A در نمونه‌های مثبت بین ۰/۱۹ تا ۱۰/۳۷ نانوگرم در گرم بود و میانگین آلودگی نمونه‌های آلوده ۳/۰٤ نانوگرم در گرم به دست آمد. بالاترین فراوانی نمونه‌های آلوده مربوط به نان‌های تافتون ماشینی (۸۸/۸٪) و لواش (۸۱/۸٪) بود، همچنین بیش‌ترین میزان آلودگی (۵/۳۹ نانوگرم در گرم) در نمونه‌های نان لواش مشاهده شد. سطح آلودگی ۱۵ نمونه (۱۷/٤٪) از مجموع ۸٦ نمونه آزمایش‌شده بیش‌ازحد مجاز (۳ نانوگرم در گرم) تأییدشده در استاندارد اتحادیه اروپا بود.

نتیجه‌گیری: در این بررسی، سطح آلودگی به اکراتوکسین A در بخشی از نمونه‌ها (۱۷/٤٪) بالاتر از حد مجاز بود، با توجه به اینکه نان قوت غالب ایرانیان است، این آلودگی می‌تواند در درازمدت بر سلامت مصرف‌کننده تأثیر نامطلوبی داشته باشد.

کلمات کلیدی: اکراتوکسین A، نان، الیزا.

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

مایکوتوکسین ها گروهی از ترکیبات سمی طبیعی هستند که توسط گونه‌های متعددی از قارچ‌ها تولید می‌گردند (۱). مایکوتوکسین ها ازنظر تنوع و ساختمان شیمیایی گروه پیچیده‌ای هستند و به‌وسیله طیف وسیعی از قارچ‌ها تولید می‌شوند (۲).

یکی از مهم‌ترین مایکوتوکسین ها اکراتوکسین A (OTA) است که به دنبال رشد برخی قارچ‌ها از جنس پنی سیلیوم و آسپرژیلوس تولید می‌شود؛ و اندر مروی در سال ۱۹۶۵ اکراتوکسین A را متابولیت ثانویه قارچ *آسپرژیلوس اوکراسئوس* گزارش نمود (۳)، بعداً در سال ۲۰۰۲ kabanas و همکاران آن را متابولیت ثانویه برخی گونه‌های جنس آسپرژیلوس و پنی سیلیوم گزارش نمودند (۴). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که اکراتوکسین A توسط قارچ‌های *پنی سیلیوم وروکوزوم* و گونه‌های آسپرژیلوس به‌ویژه *آسپرژیلوس اوکراسئوس*، *آسپرژیلوس کربوناریوس* و *آسپرژیلوس نایجر* در مواد غذایی و خوراک دام و به‌ویژه در مناطق با آب‌وهوای سرد و مرطوب تولید می‌شود (۵، ۶).

حضور اکراتوکسین A در طیف وسیعی از مواد غذایی شامل غلات، قهوه، میوه‌های خشک، آب انگور و فراورده‌های گوشتی عمل‌آوری و خشک‌شده گزارش‌شده است بااین‌وجود غلات و

فراورده‌های آن از مهم‌ترین منابع آلودگی انسان به این توکسین شناخته‌شده‌اند (۷، ۸، ۹). نگهداری نامناسب غلات انباری منشأ آلودگی غلات و فراورده‌های مشتق از آنها مانند نان آلوده به این توکسین هستند (۶).

اکراتوکسین A با فرمول شیمیایی C20H18O6NCl، مهم‌ترین توکسین گروه اکراتوکسین هاست، آن متیل استری است که در حلال‌های آلی قطبی به‌خوبی حل می‌شود (۱۰). موسسه بین‌المللی تحقیقات سرطان امریکا، اکراتوکسین A را در گروه B عوامل سرطان‌زا قرار داده است (۱۱). در بین بیش از ۳۰۰ مایکوتوکسینی که شناخته‌شده‌اند، اکراتوکسین A مهم‌ترین مایکوتوکسینی است که خاصیت تراتوژنیک، نوروتوکسیک، ژنوتوکسیک، ایمنوتوکسیک و نفروتوکسیک دارد (۵، ۱۲، ۱۳، ۱۴). همچنین برخی مطالعات نشان می‌دهد که اکراتوکسین A نقش مؤثری در فیبروز کلیه‌ها و تومورهای مجاری ادراری مثانه داشته است (۱۵). با توجه به خطرات بالقوه اکراتوکسین A در سلامت جامعه، بسیاری از کشورها و دریای آزادمان بین‌المللی حد مجاز پایینی را برای حضور احتمالی این توکسین در مواد غذایی در نظر گرفته‌اند. اتحادیه اروپا حداکثر میزان مجاز اکراتوکسین را در میوه‌های خشک‌شده و قهوه ۱۰ نانوگرم در گرم، غلات و فراورده‌های آن ۳ نانوگرم در گرم، آب انگور و فراورده‌های انگور ۲ نانوگرم در گرم و غذای کودک ۰/۵ نانوگرم در گرم در نظر گرفته است (۱۶).

مطالعات متعددی در خارج در کشورهای پرتقال، اسپانیا، آلمان، ایتالیا، بلژیک، کره، ژاپن، ویتنام، امریکای جنوبی و شمال افریقا بر روی آلودگی غلات و مواد غذایی تهیه‌شده از غلات مختلف اعم از نان گندم، برنج، ذرت و ...، به اکراتوکسین A صورت گرفته است (۱۷-۲۶)، لیکن در ایران مطالعات محدودی بر روی غلات عرضه‌شده در فروشگاه‌های شهر تهران در سال ۸۹ انجام‌گرفته است (۲۷). با توجه به اینکه اطلاعات کمی در خصوص آلودگی مواد غذایی به اکراتوکسین A در ایران وجود دارد و از طرفی بر اساس مطالعات کتابخانه‌ای گزارش مدون و ثبت‌شده‌ای از میزان و سطح آلودگی نان به این مایکوتوکسین در ایران مشاهده نشده است، مطالعه حاضر به بررسی وضعیت آلودگی یکی از پرمصرف‌ترین اقلام مصرفی خانوارهای ایرانی در استان چهارمحال و بختیاری به اکراتوکسین A می‌پردازد.

مواد و روش‌ها:

نمونه‌گیری: مطالعه حاضر توصیفی از نوع میدانی-کاربردی و جامعه آماری نان‌های تولیدشده در شهر شهرکرد می‌باشد. در این مطالعه درمجموع تعداد ۸۶ نمونه (مطابق مقالات مرتبط) انواع نان تولیدی در شهر شهرکرد شامل تافتون ماشینی، لواش، تافتون تنوری، سنگک، خانگی، باگت و صنعتی جمع‌آوری گردید (جدول ۱). نمونه‌گیری به‌صورت خوشه‌ای از بیست‌وپنج نانوایی شهر شهرکرد صورت پذیرفت. نمونه‌ها از هر نانوایی به‌طور تصادفی ساده جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها در شرایط مناسب در دمای ۴ درجه سلسیوس به آزمایشگاه منتقل شد و تا زمان انجام مطالعه به‌صورت منجمد و در شرایط ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها: به میزان ۵۰ گرم از هر نمونه فریز شده توسط آسیاب برقی (مولینکس فرانسه) آسیاب شد تا یک ترکیب کاملاً همگنی ایجاد شد. سپس پنج گرم از نمونه آسیاب شده به لولهٔ آزمایش منتقل و ده میلی‌لیتر فسفریک اسید و ۲۰ میلی‌لیتر دی کلرومتان به آن اضافه گردید. مخلوط حاصله به مدت پنج دقیقه با دور g× 2000 سانتریفیوژ شد و لایهٔ رویی (اسید فسفریک) برداشته شد. در ادامه سوسپانسیون حاصله از کاغذ صافی واتمن ۱۲/۵ سانتیمتری (ساخت انگلستان) عبور داده شد و ۱۲ میلی‌لیتر از مایع صافی شده به داخل لولهٔ آزمایش دیگر منتقل و تحت جریان ملایم نیتروژن در ۵۰ سلسیوس قرار گرفت تا تبخیر و خشک شود. ۱/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج‌کننده و ۲ میلی‌لیتر هگزان به لوله‌ها اضافه و به مدت ۵ دقیقه با دور g× 2000 سانتریفیوژ شد. لایهٔ رویی (هگزان) برداشته شد و در پایان ۵۰ میکرولیتر از لایه زیرین با ۲۰۰ میکرولیتر بافر رقیق‌کننده رقیق گردید.

سنجش اکراتوکسین A: سطح آلودگی نمونه‌های آماده‌سازی شده با استفاده از روش الیزا به کمک کیت ریداسکرین ساخت شرکت بیوفارم آلمان و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت اندازه‌گیری شد. به این منظور ۵۰ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد و نمونه‌های آماده‌سازی شده به کمک سمپلر به حفره‌های میکروپلیت اضافه شد. ۲۵ میکرولیتر محلول کونژوگه اکراتوکسین A-HRP و ۲۵ میکرولیتر محلول آنتی‌بادی به حفره‌های میکروپلیت اضافه شد و سپس به مدت یک ساعت به دور از نور و در دمای ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس مایع موجود در میکروپلیت خارج‌شده و با ضربه زدن ملایم

به میکروپلیت و قرار دادن آن به شکل وارونه بر روی کاغذهای جاذب الرطوبه مایع موجود در حفره‌ها به‌طور کامل تخلیه شد، سپس همه حفره‌ها با ۲۵۰ میکرولیتر بافر مخصوص شستشو گردید (عمل شستشو دو بار تکرار گردید) و هر بار بعد از تخلیه مایع شستشو میکروپلیت به‌طور وارونه بر روی چندلایه دستمال‌کاغذی قرار می‌گرفت تا کاملاً باقیمانده آب شستشو خارج شود به این ترتیب موادی که بعد از این مدت در واکنش شرکت نکرده‌اند خارج می‌شوند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا به حفره اضافه شد و میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس انکوبه گردید. درنهایت برای توقف واکنش محلول قطع واکنش به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به حفره‌ها اضافه شد و میزان جذب هر نمونه با قرائت کننده الیزا (England State Fax2000) در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر قرائت و اطلاعات مربوط به میزان جذب هر حفره به تفکیک ثبت شد. با کسر میزان جذب نمونه‌ها و استانداردها بر میزان جذب استاندارد صفر، ضرب‌در ۱۰۰، درصد جذب به دست آمد. بر اساس درصد جذب نمونه‌های استاندارد و میزان اکراتوکسین A موجود در نمونه‌ها، منحنی استاندارد کالیبراسیون رسم شد و به دنبال آن بر اساس درصد جذب هر نمونه و انطباق با منحنی کالیبراسیون میزان اکراتوکسین A هر نمونه در مقیاس نانوگرم در گرم به دست آمد.

تجزیه‌وتحلیل آماری:

یافته‌های به‌دست‌آمده از آزمایش و اطلاعات جمع‌آوری‌شده با نرم‌افزار SPSS 18 و آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه جهت مقایسه میزان اکراتوکسین در انواع نمونه‌های نان و درصد آلودگی، آزمون توکی باهدف بررسی اختلاف زوجی دوبه‌دو گزینه‌ها و آزمون نسبت جهت مقایسه درصد آلودگی نمونه‌های نان در مطالعه حاضر و مطالعات مشابه مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج این مطالعه نشان داد درمجموع ۴۵ نمونه (۵۲/۳٪) از ۸۶ نمونه بررسی‌شده حامل اکراتوکسین A در محدوده بین ۰/۱۹ تا ۱۰/۳۷ نانوگرم در گرم می‌باشد. در بررسی وضعیت آلودگی ۸ نوع نان (شامل نان سنگک، بربری، تافتون، لواش، صنعتی، خانگی، باگت و ماشینی) به اکراتوکسین A بیش‌ترین فراوانی نمونه‌های آلوده مربوط به نان‌های تافتون ماشینی (۸۸/۸٪) و لواش (۸۱/۸٪) بود، همچنین بالاترین سطح آلودگی به اکراتوکسین A در نان لواش مشاهده شد (جدول ۱)، هرچند درمجموع بر اساس آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه، هیچ اختلاف آماری معنی‌داری بین سطوح آلودگی در نمونه‌های نان موردبررسی مشاهده نشد.

جدول ۱: وضعیت آلودگی انواع نان موجود در شهرکرد به اکراتوکسین A

نوع نان	تعداد نمونه	تعداد نمونه‌های آلوده (درصد)	میانگین مقدار اکراتوکسین در نمونه‌ها (نانوگرم در گرم)	انحراف معیار
تافتون ماشینی	۹	۸ (۸۸/۸)	۲/۶۰	۳/۲۴
لواش	۱۱	۹ (۸۱/۸)	۲/۵۷	۱/۷۶
بربری	۱۰	۴ (۴۰)	۳/۰۳	۱/۴۳
سنگک	۱۲	۵ (۴۱/۷)	۰/۶۴	۰/۳۱
باگت	۹	۳ (۳۳/۳)	۱/۰۳	۰/۴۵
خانگی	۱۵	۶ (۴۰)	۲/۵۳	۱/۳۰
تافتون تنوری	۱۳	۸ (۶۱/۵)	۳/۹۴	۳/۳۲
صنعتی	۷	۲ (۲۸/۶)	۰/۷۷	۰/۱۵
مجموع	۸۶	۴۵ (۵۲/۳)	۲/۶۱	۱/۴۷

تیمار با سود همانند روش انتشار فعالیت ضد میکروبی را به صفر رسانید.

بحث

اکراتوکسین A یکی از مایکوتوکسین های تولیدی توسط قارچ‌های آسپرژیلوس و پنی سیلیوم می‌باشد. اسپور این قارچ‌ها به‌طور وسیعی در محیط پراکنده است و بسیاری از مواد غذایی خصوصاً غلات به این قارچ‌ها آلوده می‌شوند (**۱۱، ۲۸**). مطالعه حاضر نشان داد که بیش از ۵۰٪ از نمونه نان‌های موردبررسی در شهر شهرکرد از استان چهارمحال و بختیاری، آلوده به اکراتوکسین A می‌باشد و سطح آلودگی در نمونه‌های آلوده در محدودهٔ وسیعی مابین ۰/۱۹ تا ۱۰/۳۷ نانوگرم در گرم متغیر است. نتایج این بخش از مطالعه مطابق مطالعات انجام‌شده در مجارستان، آلمان و اسپانیا ست (**۲۹، ۳۰، ۳۱**)؛ اما سطح آلودگی در مقایسه با مطالعات Gelising از لهستان، Powoloik از یوگسلاوی و Abozeid از عربستان بیشتر بوده است (**۲، ۸، ۳۲**). Abosoum میزان وقوع آلودگی نان را به اکراتوکسین A به روش کروماتوگرافی با لایه نازک مورد ارزیابی قرارداد و نشان داد، تنها

۳ نمونه از ۵۰ نمونه بررسی‌شده حامل اکراتوکسین A است، سطح آلودگی نمونه‌های آلوده در بررسی اسبوم، ۰/۲۱، ۲/۹ و ۰/۴۹ میکروگرم در گرم گزارش‌شده است (۳۳)؛ که معرف این است که گرچه درصد آلودگی نمونه‌ها در این مطالعه بسیار پایین‌تر از مطالعه حاضر بوده است بااین‌وجود سطح آلودگی نمونه‌های مثبت بامطالعه حاضر بسیار مشابه است.

در بررسی Writer و همکاران در اتریش، از ۳۰۰ نمونه ماده غذایی بررسی‌شده به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، درصد آلودگی ۳۲ درصد و محدودهٔ آلودگی بین ۰/۰۱ تا ۲/۰۹ نانوگرم در گرم گزارش‌شده است (۳۴). بررسی Bnto و همکاران در کشور پرتغال حاکی از آن است که بیش از ۵۰٪ نمونه‌ها به اکرا توکسین A آلوده هستند. همچنین سطح آلودگی ۰/۴۹ نانوگرم در گرم گزارش‌شده است. نتایج این مطالعات به‌طور معنی‌داری بامطالعه حاضر مطابقت دارد (۶). jan و همکاران در بررسی دیگر در کشور مراکش بر روی نان گندم و ذرت نشان دادند که ۱۲/۹٪ از انواع نان گندم و ۷۰٪ از انواع نان ذرت به اکراتوکسین A آلوده هستند (۱۸). اگرچه درصد آلودگی نمونه‌ها در این مطالعه مشابه مطالعه حاضر است اما سطح آلودگی نمونه‌های آلوده بیشتر از مطالعه حاضر بود. همچنین مطالعه حاضر در مقایسه با بررسی زین‌الدین و همکاران از مراکش بر روی ۱۰۰ نمونه نان گندم درصد و میزان آلودگی کمتری را نشان داد (۱۲).

Mah tabani و همکاران در سال ۱۳۸۹ در بررسی بر روی غلات عرضه‌شده در فروشگاه‌های شهر تهران و سنجش به روش HPLC میزان آلودگی به اکراتوکسین را صفر گزارش نمودند (۲۷). درمجموع نتایج مطالعه حاضر و مقایسه آن با مطالعات مشابه نشان می‌دهد وضعیت آلودگی مواد غذایی در مناطق مختلف بسیار متفاوت بوده است. علت این امر را می‌توان به موقعیت جغرافیایی متفاوت و نهایتاً آب‌وهوای متفاوت نسبت داد. علاوه بر آن سطح بهداشت و رعایت اصول کیفی در طول فرآیند برداشت غلات، نگهداری و حمل‌ونقل نیز نقش مؤثری در رشد قارچ بر روی غلات دارد. همچنین فرآیند آسیاب گندم و نگهداری صحیح آرد تا زمان مصرف نیز می‌تواند یکی دیگر از فاکتورهای مؤثر بر میزان آلودگی آرد به اکراتوکسین A باشد (۱۲، ۳۵).

نکته آخر اینکه در این بررسی یکی از اهداف مطالعه، مقایسه آلودگی انواع نان‌های مصرفی به سم اکراتوکسین A بود که در عمل اختلاف معنی‌داری در آنها مشاهده نشد که دلایل مختلفی می‌تواند داشته باشد: یکی اینکه می‌تواند تعداد کم نمونه تهیه‌شده از هر نوع نان باشد و لازم است در آینده بررسی جامع‌تری صورت گیرد، در بررسی حاضر به دلیل محدودیت زمانی و هزینه‌ای امکان بررسی نمونه‌های بیشتر نبود، همچنین دلیل دیگر می‌تواند سوبسترای نان که در حقیقت گندم است، باشد در بررسی حاضر به نوع گندم یا آرد تهیه‌شده، روش نگهداری و مدت نگهداری آرد یا گندم مصرفی توجه نشد، بررسی‌ها نشان داده است که قارچ‌های مولد اکراتوکسین اغلب در زمان نگهداری و انبار نمودن غلات باعث آلودگی و تولید اکراتوکسین A در آن‌ها می‌شوند (۲۳).

همان‌طور که در مطالعه حاضر مشاهده گردید، سطح آلودگی به اکراتوکسین A در ۱۷/۴٪ نمونه‌ها بالاتر از حد مجاز بود، با توجه به اینکه نان قوت غالب ایرانیان است و درصد بالایی از انرژی و مواد معدنی موردنیاز انسان در ایران از این فرآورده غذایی بابرکت تأمین می‌شود، این آلودگی می‌تواند در درازمدت بر سلامت مصرف‌کننده تأثیر نامطلوبی داشته باشد. لذا رعایت اصول بهداشت و ایمنی در طول فرآیند بهداشت، نگهداری و حمل‌ونقل گندم و آرد جهت کاهش آلودگی گندم و آرد به قارچ‌ها و به دنبال آن توکسین های قارچی توصیه می‌شود. همچنین مصرف سریع و به‌موقع آرد می‌تواند در کاهش آلودگی قارچی و توکسین های آن مؤثر باشد. از طرفی پایش منظم و دقیق نمونه‌های گندم، آرد و نان‌های عرضه‌شده در استان‌های مختلف کشور پیشنهاد می‌گردد. در پایان توصیه می‌شود در مطالعات بعدی به دنبال عمل مشتق سازی اکراتوکسین A، از روش HPLC همراه با ردیاب فلورسنت جهت بررسی آلودگی استفاده گردد.

تقدیر و تشکر

از کلیه عزیزانی که در انجام این پروژه ما را یاری نمودند، کمال تشکر و سپاس‌گزاری را می‌نماییم.

References

1. Andersen A. "Cereals and cereal products: trace elements, pesticides, nutrients, food additives, nitrate and nitrite, ochratoxin-A and ergots.« Publikation. Statens Levnedsmiddelinstitut (1984).

2. Abouzied MM, Horvath AD, Podlesny PM, Regina NP, Metodiev VD, Kamenova-TozevaRM, Niagolova ND, Stein AD, PeropoulosEA, Ganev VS. Ochratoxin A concentration in food and feed from region with Balkan Endemic Nephropathy. Food Addit Contam. 2002; 19(8): 755–764.

3. Van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by Aspergillus ochraceus. Nature 1965; 205: 1112-1113.
4. Cabañes FJ, Accensi F, Bragulat MR, Abarca ML, Castellá G, Minguez S, Pons A. What is the source of ochratoxin A in wine? Int J Food Microbiol. 2002; 79: 213-215.
5. Alvarez L, Gil AG, Ezpeleta O, Garcia jalon JA, Lopens de Cerain A. Immunotoxic effectcs of ochratoxin A in vistar rats after oral administration. Food ChemToxicol. 2004; 42: 825-834.

6. Bennto JMV, Pena A, Lino CM, Pereira JA. Determination of ochratoxin A content in wheat bread samples collected from the Algarve and Bragance regions, Portugal: Winter 2007. Microchem J. 2009; 91: 165-169.

7. Ghali R, Hmaissiakhlifa K, Ghorbel H, Maaroufi K, Hedili A. Incidence of aflatoxin, ochratoxin A in Tunisian foods. Food Control. 2007; 19(9): 921-924.

8. Golinski P, Grabarkiewicz- Szczesna j, Chelkowski j, Hult K, Kostecki M. Possible Sources of Ochratoxin A, in human blood in Poland. IARC Sci Publ. 1991; 115: 153-158.

9. Goryacheva IY, De Saeger S, Eremin SA, VanPeteghem C. Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: evolution from single to multiple analyet screening: A review. Food Addit Contam. 2007; 24: 1169-1183.

10. Ringot D, Chango A, Schneider Y, Larondelle Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. Chem Biol Interact. 2006; 159: 18-46.
11. International Agency for Research on Cancer (IARC). Summary of data reported and evalution, Naturally occurring aflatoxins. 1993; 56: 245.

12. Zinedine A, Juna C, Adrissi L, Manes j. Occurrence of ochratoxin A in bread consumed in Morocco. Microchemical journal. 2007; 87: 154-158.

13. Matrella R, Monaci L, Milillo Ma. Palmisano F, Tantillo MG. Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples form swines slaughtered in southern Italy. Food Control. 2006; 17: 114-117.

14. Van Egmond HP, Van der Molen EJ. Paulsch WE. National Institute of Public Health and Environmental Protection, 1984, RIVM report, Bilthiven, the Netherland (in Dutch) NO.647704001.

15. Matrella R, Monaci L, Milillo MA, palmisano F, Tantillo MG. Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples form swines slaughtered in southern Italy. Food Control. ۲۰۰٦; 17: 114-117.

16. European Commission Regulation. Maximum limits for ochratoxin A in certain foodstuffs. Partial Regulatory Impact Assessment The Contaminants in Food(Scotland) Regulations 2005.

17. Kumagai S, Nakajima M, Tabata S, Ishikuro E, Tanaka T, Norizuki H, Itoh Y,Aoyama K, Fujita K, Kai S, Sato T, Saito S, Yoshiike N, Sugita-Konishi Y. Aflatoxin and ochratoxin A contamination of retail foods and intake of these mycotoxins in Japan. Food Addit Contam. 2008; 9: 1101-1106.

18. Juan C, Pena A, Lino C, Moltó JC, Mañes J. Levels of ochratoxin A in wheat and maize bread from the central zone of Portugal. Int J Food Microbiol. 2008;127: 284-289.

19. Juan C, Lino CM, Pena A, Moltó JC, Mañes J, Silveira I. Determination of ochratoxin A in maize bread samples by LC with fluorescence detection. Talanta, 2007; 73: 246-250.

20. Duarte SC, Bento JMV, Pena A, Lino CM. Ochratoxin A exposure assessment of the inhabitants of Lisbon during winter 2007/2008 through bread and urine analysis. Food Addit Contam. 2009;26: 1411-1420.

21. Osnaya LG, Castillo JMS, Cortés JCM, Vinuesa JM. Extraction and analysis of ochratoxin A in bread using pressurised liquid extraction and liquid chromatography. J Chromat A. 2006; 1113: 32-36

22. Legarda TM, Burdaspal PA. Occurrence of ochratoxin A in samples of bread marketed in Spain and twelve other countries. Alimentaria. 2001; 321: 89-96.

23. Duarte SC, Pena A, Lino CM. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. Food Microbiol. 2010; 27:187-198.

24. Yang C, Wang Y, Marty J-L,Yang X. Aptamer-based colorimetric biosensing of ochratoxin A using unmodified gold nanoparticles as indicator. Biosensors and Bioelectronics. 2011; 26: 2724-2727.

25. Yu F, Vdovenko MM, Wang J, Sakharov S. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assays with chemiluminescent and colorimetric detection for the determination of ochratoxin A in food. J Agric Food Chem. 2011; 59: 809-813.

26. Girolamo A De, McKeague M, Miller J D, DeRosa M C, Visconti A. Determination of ochratoxin A in wheat after clean-up through a DNA aptamer-based solid phase extraction column. Food Chem. 2011; 127(3): 1378–1384.

27. Mahtabani A, Bayat M, Hosseini SE, Aminafshar M, Tavakoli H. Assessment of Ochratoxin A and Aflatoxin B1, B2, G1, G2 Rates in Breakfast Grains of Supermarkets in Tehran Using HPLC Method in 2010. Hakim Res J. 2011; 14(1): 10-15.

28. Lund B, Baird- parker TC, Gould GW(Eds), The Microbiological Safety and Quality of Food, vol. II.Springer Science, NEW YORK, USA.PP.1490-1517.

29. Gonzalez –Osnaya L, Soriano Jm, Molto Jc, Manes j. Dietary intake of ochratoxin A from conventional and organic bread. Int J Food Microbiol. 2007; 118: 87-91.

30. Frank HK. Food Contamination by Ochratoxin A in (Germany.)Meta- Anahysis(IARC) Scientific Publication(Lyon). 1991; 115: 77-81.

31. Schaaf GJ, Nijmeier SM, Maas RFM, Roestenberg P, De Groene EM. Fink- Gremmles j. The role of oxidative stress in ochratoxin A – mediated toxicity in proximal tubular cells. Biochim Biophys Acta. 2002; 1588(2):149-58.

32. Pavlovic M, Plestina R, Krogh P. Ochratoxin A contamination of Food Stuffs in an area with Balkan (endemic) nephropathy. Acta Pathol Microbiol Scand. 1979; 87: 243-246.

33. Osborne BG. The occurrence of Ochratoxin A in mouldy bread and flour. Food Cosmet Toxicol. 1980; 18(6):615-7.

34. Reiter EV, Cichna- Markl M, Chung DH, Shim WB, Zentek J, Razzazi- FazeliE. Determination of ochratoxin A in grains by immuno – ultrafiltration and HPLC – fluorescence detection after post column derivatisation in an electrochemical cell. Anal Bioanal Chem. 2011; 400(8):2615-22.

35. Juan C, Zinedine A, Idrissi L and Manes J. Ochratoxin A in rice on the Moroccan retail market. Int J Food Microbiol. 2008; 126: 83-85.